

Avaliação *in vivo* do potencial de redução de colesterol, da capacidade antioxidante e anti-inflamatória de farelo de arroz

Madalena Frias do Vale Garrido

Dissertação para obtenção do grau de mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Luísa Corvo

Coorientador: Professora Doutora Anabela Raymundo

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Luísa Teixeira de Azevedo Rodrigues Corvo, Investigadora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Doutora Sandra Isabel Dias Simões, Investigadora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Quero agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação, nomeadamente:

À Professora Doutora Maria Luísa Corvo, pela competência científica e espírito de exigência, pelo acompanhamento e paciência inesgotável que teve para me explicar todos os processos laboratoriais que necessitei de aprender, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes, feitas durante a orientação.

À Professora Doutora Anabela Raymundo, pela sua disponibilidade e orientação, pelo apoio e ajuda prestada e pela cuidadosa revisão deste documento.

À Professora Doutora Sandra Simões, da Faculdade de Farmácia de Lisboa, pela disponibilidade e generosidade reveladas, pela experiência científica, partilha de conhecimento e pelas correções e conselhos na elaboração deste trabalho.

À DNAtch, pela oportunidade de visita ao laboratório bem como informação pormenorizada sobre o seu funcionamento.

Aos meus pais, namorado, família e amigos por todo o apoio, incentivo, paciência e compreensão.

Por fim a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o impacto da ingestão de farelo de arroz, um dos principais subprodutos ainda muito desvalorizado da Indústria Arrozeira, na prevenção de patologias, nomeadamente avaliar a administração *in vivo* de duas doses de farelo de arroz estabilizado e desengordurado. Assim, foram efetuados ensaios em animais roedores para a avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade, bem como, avaliação do efeito da ingestão nos níveis de colesterol, e ainda, a avaliação do efeito antioxidante e anti-inflamatório do farelo de arroz ingerido. Com estes estudos observou-se que uma única administração de farelo não está associada a sinais de toxicidade macroscópicos nem microscópicos e não é possível estabelecer uma relação de efeito com os níveis de colesterol plasmático. Contudo a ingestão repetida de farelo de arroz poderá estar associada a modificações dos níveis de colesterol plasmático, mas que carece de estudos posteriores de confirmação. No entanto, permitiu observar que o farelo de arroz desengordurado apresenta sinais de toxicidade. O estudo do efeito antioxidante do farelo de arroz não apresentou conclusões muito relevantes, mas foi possível observar que a ingestão de farelo de arroz não apresenta efeito benéfico na proteção do *stress* induzido pelo etanol. Quanto à atividade anti-inflamatória, para doses mais baixas dos dois tipos de farelo testados observou-se inibição do edema, ainda que não estatisticamente diferente das respetivas doses mais altas.

Palavras-chave: farelo de arroz; toxicidade; colesterol; antioxidante; anti-inflamatório

Abstract

The present work aims to assess the impact of rice bran ingestion, one of the by-products still undervalued by Rice Industry on preventing diseases, in particular to evaluate the *in vivo* administration of two rice bran stabilized and defatted doses. Thus, rodent animal testing/experiments to evaluate possible initial signs of toxicity were made, as well as the evaluation of the effect of ingestion on cholesterol levels and the antioxidant and anti-inflammatory effect of ingested rice bran. These studies revealed that a single administration of bran is not associated with macroscopic or microscopic toxicity signs and it is not possible to establish a effect relation with plasmatic cholesterol levels. However, the repeated ingestion of rice bran may be associated with changes in plasmatic cholesterol levels but it needs further confirmation studies. Nevertheless it was possible to observe that defatted rice bran shows toxicity signs. The study of the antioxidant effect of rice bran did not present relevant conclusions but it was possible to observe that the rice bran ingestion has no beneficial effect on protecting the stress induced by ethanol. As for anti-inflammatory activity for lower doses of the two types of bran tested, it was observed inhibition of the edema although not statistically different from higher doses.

Keywords: rice bran; toxicity; cholesterol; antioxidant; anti-inflammatory

Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas	X
Lista de Abreviaturas	XI
I. Introdução.....	1
II. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Arroz	4
2.1.1. Estrutura e composição química do grão de arroz	4
2.1.2. Variedades de arroz.....	6
2.1.3. Processos de transformação do arroz.....	7
2.2. Farelo de Arroz.....	7
2.2.1. Composição do farelo de arroz	7
2.2.2. Processamento do farelo de arroz	9
2.2.3. Óleo de farelo de arroz	12
2.2.4. Farelo desengordurado.....	13
2.2.5. Benefícios para a saúde do farelo de arroz.....	13
2.2.6. Aplicações do farelo de arroz.....	16
2.2.7. Futuro potencial do farelo de arroz	17
2.3. Avaliação <i>in vivo</i> da ingestão de farelo de arroz.....	18
III. Materiais e Métodos.....	24
3.1 Materiais.....	24
3.2 Métodos	25
3.2.1 Tratamento prévio do farelo	25
3.2.2. Avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações do colesterol plasmático (Dose única)	25

3.2.3. Avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações do colesterol plasmático (Dose Múltipla).....	27
3.2.4. Avaliação do efeito antioxidante no modelo animal de <i>stress</i> oxidativo induzido pelo álcool	28
3.2.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação .	31
3.2.6. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos e análises histológicas.....	33
3.2.7. Análise Estatística.....	38
IV. Resultados e Discussão	39
V. Conclusões.....	69
VI. Referências Bibliográficas	72

Índice de Figuras

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

Figura II. 1. Constituição do bago de arroz (Fonte: Josapar, 2015)	4
Figura II. 2. Estrutura do grão de arroz (Fonte: http://www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroz/grao/)	5

Capítulo III – Materiais e Métodos

Figura III. 1. Cronograma do ensaio de avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações no colesterol plasmático (Dose única).	25
Figura III. 2. Cronograma do ensaio de avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações do colesterol plasmático (Dose múltipla).	27

Capítulo IV – Resultados e Discussão

Figura IV.1.A. 1. Peso de cada animal dos vários grupos em estudo durante o tempo do ensaio 1.A. Cada cor corresponde a um animal do estudo (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg.	41
Figura IV.1.A. 2. Curva de crescimento da estirpe CD1 do fornecedor Charles River Laboratories.	42
Figura IV.1.A. 3. Quantidade média de água consumida por animal, para cada grupo em estudo, ao longo do tempo para o ensaio 1.A (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg 42	
Figura IV.1.A. 4. Quantidade média de ração consumida por animal, para cada grupo em estudo, ao longo do tempo para o ensaio 1.A (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg 43	
Figura IV.1.A. 5. Peso dos órgãos normalizado ao peso corporal de cada animal para os diferentes grupos. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).	45

Figura IV.1.A. 6. Peso de cada órgão (fígado, baço, rim e coração) dos animais dos vários grupos do ensaio 1.A normalizado ao peso corporal. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). 46

Figura IV.1.B. 1. Peso de cada animal dos vários grupos em estudo durante o tempo do ensaio 1.B. Cada cor corresponde a um animal do estudo (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). 48

Figura IV.1.B. 2. Quantidade média de água consumida por animal para cada grupo, ao longo do tempo no ensaio 1.B. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). 49

Figura IV.1.B. 3. Quantidade média de ração consumida por animal para cada grupo, ao longo do tempo no ensaio 1.B. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). 50

Figura IV.1.B. 4. Peso dos órgãos normalizado ao peso corporal de cada animal para os diferentes grupos. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). 52

Figura IV.1.B. 5. Peso de cada órgão (fígado, baço, rim e coração) dos animais dos vários grupos do Ensaio 1.B normalizado ao peso corporal. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). [*] $p < 0.05$ versus Grupo I (Teste F). 53

Figura IV.1.B. 6. A. Microfotografia do fígado de um animal do Grupo I (controlo); B. Microfotografia do fígado de um animal do Grupo IV ilustrando um infiltrado inflamatório; (ampliações, 100x). 54

Figura IV.2. 1. Quantidade de colesterol total doseado no plasma dos animais dos vários grupos na dose única, 7 dias após a administração. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo

Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). 55

Figura IV.2. 2. Quantidade de colesterol total doseado no plasma dos animais dos vários grupos do ensaio B, 14 dias após a administração. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). [*] $p < 0.05$ versus Grupo I (one-way ANOVA). 56

Figura IV.3. 1. Peso dos animais dos vários grupos em estudo durante o tempo do Ensaio C. Cada cor corresponde a um animal do estudo. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol. 59

Figura IV.3. 2. Curva de crescimento da espécie/estirpe Wistar do fornecedor Charles River Laboratories. 60

Figura IV.3. 3. Consumo de água, por animal, para cada grupo, durante o ensaio. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol. 61

Figura IV.3. 4. Consumo de ração, por animal, para cada grupo, durante o ensaio. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol. 61

Figura IV.3. 5. Valores das atividades das enzimas AST, ALT, ALP e Gama-GT quantificadas no soro dos animais no final do ensaio. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo

de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol. 62

Figura IV.3. 6. Peso dos órgãos normalizado para cada grupo de tratamento. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol. [*] $p<0.05$ versus Grupo I; [**] $p<0.05$ versus Grupo II; [***] $p<0.05$ versus Grupo III; [****] $p<0.05$ versus Grupo IV (álcool); (Teste F). 63

Figura IV.4. 1. Variação do volume da pata, na inflamação induzida pelo Carragenano em cada grupo experimental (n=6). Grupo I – Controlo negativo (água); Grupo II – Controlo positivo (indometacina); Grupo III – Farelo desengordurado dose 1 (500 mg/kg); GIV – Farelo desengordurado dose 2 (250 mg/kg); GV – Farelo Estabilizado dose 1 (500 mg/kg); GVI – Farelo Estabilizado dose 2 (250 mg/kg). 66

Figura IV.4. 2. Variação média do volume da pata na inflamação induzida pelo Carragenano. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão (n=6). Grupo I – Controlo negativo (água); Grupo II – Controlo positivo (indometacina); Grupo III – Farelo Desengordurado dose 1 (500 mg/kg); GIV – Farelo Desengordurado dose 2 (250 mg/kg); GV – Farelo Estabilizado dose 1 (500 mg/kg); GVI – Farelo Estabilizado dose 2 (250 mg/kg). [*] $p<0.05$ versus Grupo I (one-way ANOVA). 67

Figura IV.4. 3. Percentagem de Inibição do desenvolvimento do edema, relativamente ao Grupo I de controlo. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão (n=6). Grupo II – Controlo positivo (indometacina); Grupo III – Farelo Desengordurado dose 1 (500 mg/kg); GIV – Farelo Desengordurado dose 2 (250 mg/kg); GV – Farelo Estabilizado dose 1 (500 mg/kg); GVI – Farelo Estabilizado dose 2 (250 mg/kg). 67

Índice de Tabelas

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

Tabela II. 1. Composição média (% na matéria seca) de produtos da indústria arrozeira (Adaptado de Juliano & Bechtel, 1985).....	9
Tabela II. 2. Componentes bioativos presentes no farelo de arroz e respetiva atividade biológica para a saúde humana (Adaptado e modificado de Borresen & Ryan, 2014).	14

Capítulo III – Materiais e Métodos

Tabela III. 1. Esquema de tratamento do ensaio de avaliação do efeito antioxidante no modelo animal de <i>stress</i> oxidativo induzido pelo etanol.....	30
---	----

Capítulo IV – Resultados e Discussão

Tabela IV.1.A. 1. Evolução do peso médio das fezes coletadas por animal, por dia, após a administração para cada grupo experimental (Dia 0 – dia da administração). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).	43
Tabela IV.1.B. 1. Evolução do peso médio das fezes coletadas por animal, por dia, após a administração para cada grupo experimental (Dia 0 – dia da administração). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).	51
Tabela IV.3. 1. Distribuição temporal e por grupo de tratamento do número de animais que morreram no decurso do Ensaio 3. Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol); Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol.	58

Lista de Abreviaturas

ALP – Fosfatase Alcalina

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

GGT – Gama-glutamil transferase

LDH – Lactato Desidrogenase

LDL - *Low Density Lipoproteins*

HDL – *High-Density Lipoproteins*

OFA – Óleo de farelo de arroz

ROS - Reactive Oxygen Species

VLDL – *Very-Low-Density Lipoproteins*

I. Introdução

O arroz constitui uma cultura de relevo, tendo em conta a extensão de superfície cultivada e a quantidade de população que depende da sua colheita. Constitui um alimento de primeira necessidade para mais de metade da população mundial (Wani et al., 2015). A produção global de arroz no ano de 2010 ascendeu a 7×10^6 toneladas (FAOSTAT, 2012), sendo a Ásia (China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietname e Tailândia) responsável pela produção de mais de 90 % de todo o arroz mundial (FAO, 2013).

Relativamente ao consumo de arroz, a maioria dos consumidores tem preferência pelo arroz branqueado com pouco ou nenhum farelo restante e com características sensoriais mais suaves (aspeto, sabor, aroma e textura) (Roy, Ijiri et al., 2008). Dos 475 milhões de toneladas de arroz branqueado produzido globalmente, 85% destina-se ao consumo humano e os restantes 15% é utilizado na alimentação animal ou é desperdiçado (FAO, 2013). Dados estatísticos indicam que o total de arroz branqueado consumido em Portugal ultrapassa a quantidade produzida, pelo que se torna necessária a sua importação. A produção nacional de arroz ronda as 167 mil toneladas, colocando Portugal como o terceiro maior produtor europeu. Com um consumo *per capita* é de 15,9 kg, Portugal é o maior consumidor da Europa, que tem um consumo *per capita* médio de 5/6 kg/habitante/ano (INE, 2014).

A produção de arroz suficiente e sustentável é, portanto, crucial para a segurança alimentar mundial (Erlich, 2004). No entanto, existe um grande desperdício a nível mundial dos subprodutos associados a processos de transformação e produção de arroz como, por exemplo, a casca e, principalmente, o farelo. Este último apresenta-se assim como um subproduto do processamento do arroz, sendo a porção integral retirada do grão durante os processos de polimento e branqueamento. Atualmente, os resíduos agrícolas têm sido alvo de grande foco, no sentido de minimizar o desperdício e, consequentemente, o detrimento ambiental causado. Desse modo, têm sido feitos estudos que conduzem a evidências de que os resíduos agrícolas são fontes de antioxidantes naturais (Salanti et al., 2010).

Isto aplica-se ao farelo de arroz que tem sido apontado como considerável fonte de proteína, fibra alimentar, vitamina B, ácidos gordos essenciais insaturados, minerais e compostos fenólicos (Malekian et al., 2000). Ainda é rico em compostos antioxidantes

como polifenóis, orizanol, vitamina E e carotenóides que ajudam a prevenir danos oxidativos no ADN e nos tecidos (Jariwalla, 2001).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), a indústria mundial de arroz produz, anualmente, cerca de 63 a 76 milhões de toneladas de farelo de arroz, que poderiam encontrar-se disponíveis para consumo humano. Deste modo, 90% do farelo de arroz produzido no mundo é desvalorizado, associado a aplicações de baixo valor económico, principalmente na alimentação animal, e o restante usado para extração de óleo ou como fertilizante orgânico (Shramm et al, 2007).

Dado o elevado valor nutricional do farelo de arroz, o seu aproveitamento em produtos industrializados é visto como uma mais-valia, pelo que várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de avaliar o seu potencial para a alimentação humana. Contudo, por apresentar um tempo de vida útil muito curto, devido ao alto teor em lípidos, o farelo apresenta uma rápida deterioração do óleo que entra em contacto com a enzima lípase no decorrer dos processos de transformação do arroz, tornando o farelo rançoso e não comestível. Torna-se de extrema importância a sua estabilização por inativação da atividade enzimática, de forma a aumentar a estabilidade e, fundamentalmente, o tempo de vida útil do farelo, para possíveis aplicações na indústria alimentar (Wani et al., 2015).

Em alguns países, o farelo de arroz já tem vindo a encontrar variadíssimas aplicações na indústria alimentar, seja como farelo estabilizado ou desengordurado, de forma a aumentar a qualidade nutricional de alguns alimentos processados como pão, bolos, massas e gelados, sem afetar significativamente as propriedades nutricionais e estruturais. Por ser rico em fibra alimentar e em diversos antioxidantes, e tendo em vista o seu potencial terapêutico, a adição de farelo de arroz a alimentos pode contribuir para o desenvolvimento de produtos de valor acrescentado ou alimentos funcionais, que atualmente estão em grande ascensão (Wani et al., 2015).

O presente trabalho insere-se no âmbito do projeto Arroz+, Projeto QREN I&DT em Co-Promoção nº38749, cujo principal objetivo foi a valorização de subprodutos da indústria arroseira, nomeadamente do farelo de arroz. No âmbito desse projeto realizado no Departamento de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, foi estudada a possibilidade de incorporação de farelo em diversas matrizes alimentares (bolachas, pão, sobremesas e massas alimentícias). O interesse em estudar o farelo de arroz prende-se com a importância que este subproduto de valor acrescentado poderá trazer na sua introdução na alimentação humana.

Pretende-se, no âmbito deste trabalho, analisar qual o impacto, avaliado em modelos *in vivo*, da ingestão de farelo de arroz na identificação de:

- Possíveis sinais iniciais de toxicidade;
- Alterações nos níveis de colesterol plasmático;
- Efeito antioxidante utilizando um modelo de *stress* oxidativo induzido pelo etanol;
- Atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação.

A presente dissertação segue o Regulamento n.º 334/2015 dos Ciclos de Estudo Conducentes ao Grau de Mestre do Instituto Superior de Agronomia e encontra-se dividida em cinco capítulos sendo o capítulo I a presente introdução, o capítulo II refere-se à revisão bibliográfica, o capítulo III descreve os materiais e métodos utilizados na realização dos ensaios e o capítulo IV, Resultados e Discussão, constituído pela apresentação e análise dos resultados obtidos. Por último, no capítulo V, tecem-se considerações sobre as conclusões mais importantes retiradas com a execução deste trabalho, bem como, são apresentadas algumas sugestões para trabalhos a desenvolver futuramente que visam não só complementar o trabalho realizado como abrir novos percursos de investigação.

II. Revisão bibliográfica

2.1. Arroz

O arroz pertence à família *Poaceae* e inclui duas espécies cujos nomes científicos são *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* S., de origem asiática e africana, respetivamente (Liu, Waters et al., 2013).

A planta de arroz (*Oryza sativa*) é uma planta herbácea incluída na classe das monocotiledóneas, apresenta genomas completamente sequenciados de duas subespécies, *Indica* e *Japonica* (Vaughan, Lu et al., 2008; Qi, Zhang et al., 2009). As variedades *Indica* são geralmente adaptadas a climas tropicais, enquanto as variedades *Japonica* são adaptadas a climas mais temperados (Johns e Mao, 2007; Vaughan, Lu et al., 2008).

Em Portugal, no início do século XX, foram estabelecidas as bases para a produção de arroz e, nos anos 30, os arrozais cresceram e as zonas de cultivo estenderam-se a outras regiões do país. Atualmente, o arroz é cultivado na bacia do Mondego (Figueira da Foz, Coimbra), nas bacias da Beira Baixa, na bacia do Sado (Alcácer do Sal), na bacia dos afluentes do Tejo, nas represas a Sul e noutras regiões, em menor escala. O arroz produzido em Portugal é na sua maioria cultivado em condições de regadio (Novarroz, 2015).

2.1.1. Estrutura e composição química do grão de arroz

A planta de arroz cresce geralmente em condições alagadas e é caracterizada pelas folhas longas e finas, com múltiplas inflorescências na extremidade, a panícula. Cada panícula pode conter entre 70 a 300 sementes, pelo que uma planta pode produzir milhares de grãos (Chang & Bardenas, 1965). O bago de arroz é constituído pelo núcleo ou cariopse e por uma camada protetora, a casca (Juliano, 1985).

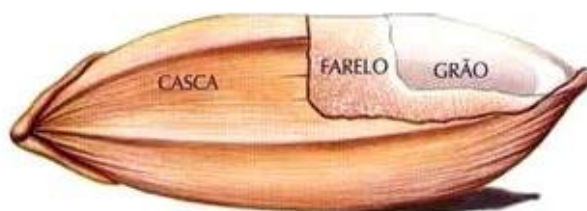


Figura II. 1. Constituição do bago de arroz (Fonte: Josapar, 2015)

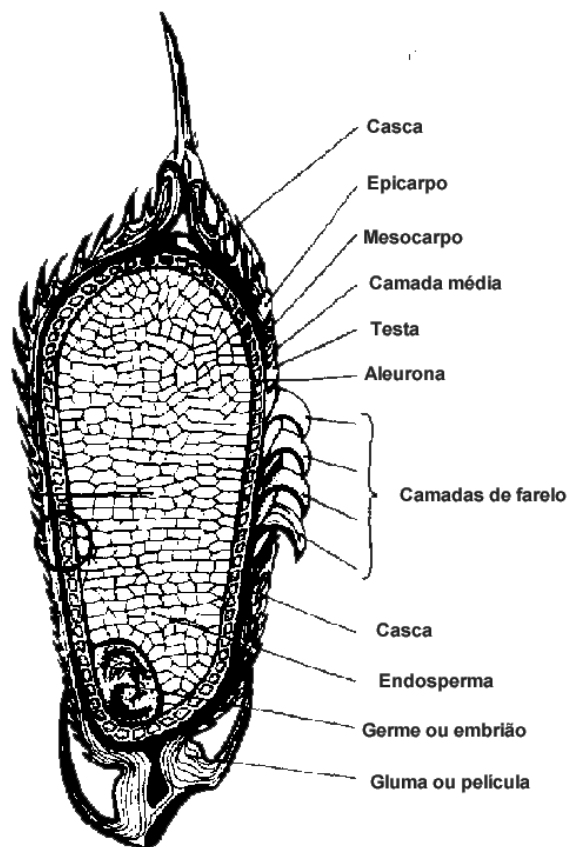


Figura II. 2. Estrutura do grão de arroz (Fonte: <http://www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroz/grao/>)

A casca é a camada protetora que contém uma defesa antioxidante que impede a semente de sofrer *stress* oxidativo e representa em média cerca de 20 % do peso total do grão (Bhattacharya, 2011; Walter et al., 2008).

O núcleo do arroz é formado por diferentes camadas, o pericarpo, o embrião e o endosperma, sendo que o último, envolvido pelo pericarpo, representa a maior parte do grão, cerca de 89-94% do arroz integral e consiste em grânulos de amido (Juliano, 1985). Na Figura II.2 é possível visualizar-se a estrutura do grão de arroz. O embrião fica localizado na base do grão e é quimicamente constituído por proteínas e lípidos, representando 2-3% do arroz integral. As camadas mais externas como o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona (que contém células livres de amido), formam o farelo. Este representa 5-8% da massa do arroz integral e 10 % da massa do arroz em casca. O arroz integral é assim obtido através da separação da casca do farelo (descasque) e este é removido com o intuito de melhorar a sua aceitação por parte do consumidor, uma vez que o farelo impede o inchaço dos grânulos de amido durante a cozedura. Assim, a sua remoção provoca uma diminuição do valor nutricional, visto que o farelo constitui a parte mais nutritiva do arroz e é uma boa fonte de compostos

fitoquímicos bioativos que têm propriedades benéficas para a saúde e grande capacidade antioxidante. É constituído essencialmente por fibras alimentares, lípidos, proteína, vitaminas e minerais (Bhattacharya, 2011; Sharif et al., 2014).

O arroz é um alimento muito valorizado pelo seu valor nutricional e o seu consumo fornece 20 % da energia nutricional mundial (FAO, 2013). É um cereal rico em glúcidos complexos (80%) e uma fonte de proteínas (7-8%), fibra (3%), lípidos (3%) e micronutrientes tais como vitaminas e minerais (Juliano, 1985).

Para além disso, o arroz é uma fonte de compostos bioativos, conhecidos como antioxidantes, nomeadamente compostos fenólicos. Os micronutrientes importantes para os seres humanos, tais como vitaminas e minerais, estão largamente presentes no grão de arroz e nas suas camadas exteriores, isto é, dentro das camadas de farelo biologicamente ativas, incluindo o embrião (McCaskill & Zhang, 1999).

Os nutrientes não se encontram uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão de arroz, uma vez que a camada externa (farelo e casca) apresenta maiores concentrações de proteínas, lípidos, fibra, minerais e vitaminas e a parte central é rica em amido. O teor de fibra, por sua vez, é superior no farelo e na casca, e inferior na parte central do grão (Juliano, 1993). Os valores acima referidos são apenas valores referência, dado que a percentagem e composição do farelo/casca/grão de arroz varia de acordo com a variedade de arroz, pré-tratamento sujeito antes do branqueamento/descasque, tipo de branqueamento/sistema e o grau de descasque/branqueamento (Sharif et al., 2014).

2.1.2. Variedades de arroz

Tendo em conta a legislação aplicável (Decreto-Lei nº 62/2000 de 19 de Abril), quanto ao estado físico do arroz, este pode ser classificado em: arroz em casca; arroz descascado, em película ou meio preparo; arroz semibranqueado e arroz branqueado. O arroz em casca, também denominado de paddy, encontra-se envolvido pela casca e não passou por quaisquer processos de transformação. Ao arroz descascado apenas foi removida a casca. Ao arroz semibranqueado foi removida a casca, uma parte do embrião e todas ou parte das camadas externas do pericarpo, mas não as camadas internas. E por último, quando já tiver sido removida a casca, a totalidade das camadas exteriores e interiores do pericarpo, a totalidade do embrião, ou pelo menos uma parte no caso do arroz de grãos redondos, referimo-nos ao arroz branqueado.

Uma grande percentagem do arroz produzido em Portugal corresponde a variedades de grão arredondado, o carolino e suas principais variedades são aríete e euro, mas também se produz arroz agulha, de grão caracteristicamente alongado (Novarroz, 2015).

2.1.3. Processos de transformação do arroz

Na cadeia do arroz as tecnologias pós-colheita têm uma importância vital, pois trata-se de um produto vivo, que continua o seu processo metabólico mesmo após a secagem, e que tem como principal objetivo a escolha das melhores e mais corretas técnicas para a preservação da integridade química, biológica e física do grão (Botelho, 2012). Existe a necessidade dos grãos de arroz sofrerem diversos processos antes de estarem próprios para consumo. O processo de transformação do arroz envolve várias operações tais como, limpeza/lavagem, secagem, armazenamento, descasque, branqueamento e polimento, sendo o descasque e branqueamento os principais processos de transformação a que o arroz é sujeito (Wani et al., 2015). Do descasque separa-se a casca do restante bago, obtendo-se o arroz integral, como processo seguinte, o branqueamento, que consiste no desgaste do grão removendo o farelo. Por fim, efetua-se o polimento do grão branqueado, tendo como produto final o arroz branco, que constitui a maior fração da produção (Gomes, 2015).

Dos processos de transformação do arroz obtém-se um rendimento de cerca de 70% do produto final (grãos inteiros e brancos) e de vários subprodutos como o farelo (8%) e a casca (20%) e o embrião (2%) (Van Hoed et al., 2006). A concentração das principais vitaminas (vitaminas do complexo B, vitamina E), bem como de minerais importantes (fósforo, cálcio, ferro, etc) diminuem progressivamente com o processo de transformação. Um extenso descasque ou branqueamento do arroz integral produz um grão que é substancialmente desprovido desses micronutrientes essenciais (Bhattacharya, 2011).

2.2. Farelo de Arroz

2.2.1. Composição do farelo de arroz

O pericarpo, o tegumento, a camada de aleurona e o germe (embrião) são eliminados durante as operações de descasque e polimento na forma de farelo de arroz, restando o endosperma (grão de arroz polido) (Lakkakula et al., 2004).

O farelo representa 5-8% do peso total do grão de arroz (Juliano, 1985). É uma das partes mais nutritivas do bago de arroz. Segundo valores indicados na Tabela II.1 o farelo de arroz contém 11,3-14,9% de proteínas, 15,0-19,7% de lípidos, 6,6-9,9% de cinzas, 13,8% de amido e 7,0-14,4% de fibra bruta, dependendo das condições de processamento (Juliano & Bechtel, 1985; Pomeranz & Ory, 1982). A composição química do farelo de arroz depende de fatores associados à variedade de arroz, condições climáticas e métodos de processamento (Grist, 1985; Freeman, 2006). Contém uma vastíssima gama de nutrientes essenciais como minerais, fibras, aminoácidos e antioxidantes (Younas et al., 2011). Como minerais principais apresenta fósforo, potássio e magnésio (Saunders, 1990). É uma excelente fonte de fibra alimentar, contém na sua maioria fibra insolúvel, com cerca de (9,5-16,9%) de hemicelulose e 5,9-9,0% de celulose (Juliano & Bechtel, 1985). É uma potencial fonte de antioxidantes naturais como orizanol, tocoferóis, tocotrienóis (Godber e Well, 1994). Os principais antioxidante presentes no farelo são os tocoferóis e orizanol, com o orizanol a possuir dez vez mais atividade antioxidante que o tocoferol, enquanto que os tocotrienóis possuem 40-60 vezes mais poder antioxidante que os tocoferóis (Abdel e Hucl, 1999). A proporção destes fitoquímicos varia de acordo com o cultivo de arroz (Iqbal et al., 2005).

Do ponto de vista organolético, o farelo apresenta uma coloração clara, sabor um pouco adocicado e tostado, ligeiramente oleoso (Hu et al., 1996). A sua textura varia entre pó fino e consistência de flocos, dependendo do processo de estabilização (Barber e Benedito-de, 1980).

Uma vantagem em relação a outros farelos (trigo, aveia, cevada e centeio) é a ausência de glúten, podendo, portanto, ser consumido por pessoas que são intolerantes ao glúten (Hammond, 1994).

Tabela II. 1. Composição média (% na matéria seca) de produtos da indústria arrozeira (Adaptado de Juliano & Bechtel, 1985)

Componentes	Arroz com casca	Arroz integral	Arroz branco	Farelo	Embrião
Proteína	5,8-7,7	7,1-8,3	6,3-7,1	11,3-14,9	14,1-20,6
Lípidos	1,5-2,3	1,6-2,8	0,3-0,5	15,0-19,7	10,1-12,4
Cinzas	2,9-5,2	1,0-1,5	0,3-0,8	6,6-9,9	4,8-8,7
Hidratos de carbono	63,6-73,2	72,9-75,9	76,7-78,4	34,1-52,3	34,2-41,4
Amido	53,4	66,4	77,6	13,8	2,1
Açúcares	0,5-1,2	0,7-1,3	0,22-0,45	5,5-6,9	8,0-12,0
Fibra bruta	7,2-10,4	0,6-1,0	0,2-0,5	7,0-11,4	2,4-3,5
Celulose	-	-	-	5,9-9,0	2,7
Hemicelulose	-	-	0,1	9,5-16,9	9,7

2.2.2. Processamento do farelo de arroz

2.2.2.1 Estabilização do farelo

Embora seja uma excelente fonte de nutrientes, o farelo de arroz tem vindo a ser desvalorizado por não ser adequado para o consumo humano, pelo que a instabilidade durante o armazenamento se apresenta como a sua maior limitação na utilização como um ingrediente alimentar (Dang, 2015).

O óleo presente no arroz com casca e no arroz integral é relativamente estável, uma vez que as enzimas lipolíticas inseridas no núcleo de arroz se encontram-se intactas, e localizam-se principalmente nas células transversais do revestimento da semente (tegumento), enquanto que a maior fração de lípidos encontra-se armazenada na camada de aleurona e no embrião (Randall et al., 1985).

O farelo de arroz fresco apresenta um tempo de vida útil muito reduzido porque, no decorrer de processos de remoção das camadas de farelo do endosperma, as células individualizadas são rompidas. As enzimas endogenamente presentes no farelo, denominadas de lipases entram em contacto com os lípidos. Esta ação enzimática das lipases conduz à hidrólise dos lípidos e à consequente formação de glicerol e ácidos gordos livres, reduzindo por sua vez o rendimento em óleo comestível. A hidrólise dos lípidos catalizada pelas lipases no farelo de arroz torna-se evidente de várias formas:

apresenta um aroma/sabor “rançoso”, um aumento da acidez, pH reduzido, alterações nas propriedades funcionais e conseqüentemente, um aumento da suscetibilidade para a oxidação dos ácidos gordos. Estes desencadeiam processos de rancificação oxidativa e resultam, fundamentalmente, não somente em radicais livres, mas também em sabor indesejável, bem como perdas de componentes valiosos como vitaminas e antioxidantes (Malekian et al., 2000). Devido a esta limitação associada à oxidação do óleo, a maioria do farelo é utilizado como aditivo com altos valores de proteína para a alimentação animal ou como fertilizante e combustível (Yoon e Kim, 1994).

Para contornar esta problemática, diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas para conservar o valor nutricional do farelo e prolongar o seu tempo de vida útil. A estabilização torna-se um pré requisito, visando a destruição ou inibição da enzima lipase ou qualquer microrganismo que cause a deteriorização do farelo, e a redução das perdas de óleo que se degrada diretamente em ácidos gordos livres (Prasad et al., 2011; Dang, 2015).

Diversos são os métodos de estabilização do farelo de arroz disponíveis como armazenamento a frio, secagem, vaporização, tratamentos químicos e expulsão/extrusão.

Prabhakar e Venkatesh (1986) desenvolveram um método de estabilização a partir do tratamento à base de ácido, com o princípio de que a atividade enzimática é reduzida a níveis baixos de pH. Este método consistia na pulverização de ácido clorídrico no farelo de arroz, pelo que este não apresentou sinais que afetassem a qualidade, e o tempo de armazenagem possivelmente chegasse aos 3 meses sem qualquer tipo de desenvolvimento de microrganismos.

Comercialmente, os tratamentos térmicos são os métodos de estabilização utilizados com maior frequência. Contudo, os tratamentos térmicos estão associados a uma diminuição de componentes valiosos no farelo, a uma remoção substancial de humidade e ainda com a possibilidade de não serem capazes de inativar por completo as enzimas (Sharma et al., 2004). Outros métodos são reconhecidos como “parboilização” (vaporização) (Nasirullah et al., 1989), radiação gama (Ramarathnam et al., 1989), refrigeração e acidificação (Amarasinghe et al., 2009).

Com base nestes dados, a extrusão de cozedura foi desenvolvida com o propósito de reduzir as perdas durante o aquecimento. Este método pode desnaturar as lipases permanentemente (Ramezanzadeh et al., 1999), mantendo a 125-130°C por alguns segundos, e antes de arrefecer a 97-99°C durante 3 minutos. Estudos revelam que o farelo pode ser armazenado de forma segura até 4 meses sem qualquer alteração por

parte dos ácidos gordos livres, em comparação com os métodos de tratamento térmico (Carroll, 1990; Randall et al., 1985).

O método de aquecimento por micro-ondas trouxe significativas melhorias e vantagens na estabilização do farelo de arroz. A energia de micro-ondas é uma fonte económica e bastante eficaz em relação ao calor em comparação com outros tratamentos térmicos. A radiação de micro-ondas pode reduzir os efeitos prejudiciais sobre o valor nutricional do farelo. Contudo, aquando da utilização deste método, deve ser adicionado água ao farelo de forma a obter um teor de humidade de 21% ou mais, e o processo pode levar 3 minutos para desnaturar as lipases (Tao et al., 1993).

Estudos recentes indicam o aquecimento óhmico, como o método promissor de estabilização de farelo de arroz associado ao melhoramento do rendimento na extração de óleo de farelo de arroz (Lakkakula, Lima & Walker, 2004). Tanto o aquecimento por micro-ondas como o óhmico são métodos eficazes para a estabilização do farelo de arroz, mas que normalmente requerem a adição de humidade à amostra antes do tratamento (Dang, 2015). Cada método de estabilização tem as suas vantagens e desvantagens a ter em consideração (Amarasinghe & Gangodavilage, 2004). Escolher um método que seja eficaz na estabilização de farelo de arroz é de extrema importância, pois este deverá inativar suficientemente as enzimas de forma a minimizar a decomposição de componentes bioativos. E com isto, converter o farelo num produto com uma maior durabilidade sob condições normais de armazenamento e tanto quanto possível, manter o valor nutricional inicial, de forma a ser, posteriormente, uma mais-valia na indústria alimentar.

2.2.2.2. Extração do óleo de farelo de arroz

Geralmente, a extração do óleo de farelo de arroz é complexa e a sua refinação dificultada pela elevada acidez, elevados componentes de insaponificáveis, de ceras (3,0%) e pela sua forte coloração (Aboissa, 2015). Estes fatores conduzem a perdas significativas, pelo que têm recebido especial atenção da investigação de forma a contornar estas perdas. O método de extração de OFA mais comum é o processo de extração por solvente orgânico utilizando hexano (Talwalker, Garg & Krishnamurti, 1965). O óleo em bruto obtido é composto por mais de 80% de triglicéridos juntamente com várias impurezas, tais como ceras, gomas, ácidos gordos livres e pigmentos. As impurezas causam má coloração e turvação na aparência do óleo, que por sua vez podem ser catalisadores de envenenamento. Por isso, as impurezas devem ser removidas pelo processo de refinação antes de se tornar um óleo comestível (Dang,

2015). No entanto, este tipo de extração tem sido alvo de controvérsia, pois apresenta vários inconvenientes, como potencial perigo de incêndio, riscos ambientais e riscos para a saúde. Para este efeito, têm sido desenvolvidos e otimizados novos métodos destacando-se a extração com fluidos supercríticos. Contudo, apesar de apresentar notórias vantagens, este tipo de tecnologia é dispendioso e necessita de infraestruturas laboratoriais nem sempre disponíveis (Patel e Naik, 2004).

2.2.3. Óleo de farelo de arroz

O farelo de arroz consiste em 15-22% de óleo, sendo o óleo de farelo de arroz (OFA) o óleo extraído do embrião e do farelo de arroz (Orthoefer, 1996).

Nos últimos anos, o mercado ocidental tem demonstrado um grande interesse pelo OFA devido ao reconhecimento dos seus benefícios para a saúde (Kim & Godber, 2001). Para além do uso tradicional como óleo vegetal, o OFA é também largamente usado na indústria farmacêutica devido às suas propriedades nutracêuticas e terapêuticas (Prasad et al., 2011). Contém cerca de 96% de componentes saponificáveis e 4% de insaponificáveis. Estes últimos são ricos em tocoferóis, tocotrienóis, uma forma de vitamina E, gama-orizanol, polifenóis, fitoesteróis e beta-sitosterol (Saika & Deka, 2011). O OFA apresenta um elevado teor em matéria insaponificável em comparação com os restantes óleos vegetais, que normalmente têm menos de 1-2% (Dang, 2015).

O OFA é um óleo equilibrado que contém ácidos gordos monoinsaturados (47%) e polinsaturados (37%), que contribuem consideravelmente para as suas propriedades nutricionais associados a diversos benefícios para a saúde (Wani et al., 2015). Os ácidos gordos livres presentes no OFA incluem ácidos gordos insaturados como ácido oleico (38,4%), ácido linoleico (34,4%), bem como ácidos gordos saturados como ácido palmítico (21,5%) e ácido esteárico (2,9%) (Rukmini & Raghuram, 1991).

OFA é uma fonte rica em fitoquímicos bioativos com propriedades antioxidantes e anticancerígenas. Tem sido também documentado que possui propriedades hipolipidémica, antiaterogénica e anti-diabetes (Chen & Cheng, 2006).

2.2.4. Farelo desengordurado

A crescente procura de óleo de farelo de arroz como um alimento saudável e funcional levou à disponibilização de quantidades apreciáveis de farelo de arroz desengordurado, um potencial subproduto obtido após a extração do óleo de farelo de arroz (Chan, Khong, Iqbal, e Ismail, 2013).

O farelo de arroz desengordurado é considerado como um produto residual do processamento de arroz. Na maioria dos casos, trata-se de um subproduto secundário muitas vezes descartado ou utilizado na alimentação animal a um preço mais barato. Apresenta elevado potencial antioxidante devido à presença de compostos bioativos como fenólicos (Devi & Arumughan, 2007; Mariod et al., 2010). Contém nutrientes importantes, uma elevada percentagem de fibra, cerca de 35-48%, que pode ser utilizada especialmente em produtos com altos teores de fibra (Badcock, 1987). Apresenta cerca de 15-20% de proteínas de alta qualidade (Mazza, 1998), que pode ser extraída por diluição alcalina, produzindo um concentrado de proteína de farelo, que contém 50-60% de proteína (Marshall, 1993). A proteína de farelo apresenta uma boa qualidade nutricional para o consumo humano, em contraste com a maioria das proteínas obtidas por cereais, registando um alto valor em lisina (Juliano, 1985). A proteína concentrada de farelo de arroz poderá ser, portanto, um excelente aditivo em produtos alimentares (Mazza, 1998).

De salientar ainda, que o farelo de arroz desengordurado apresenta valores nutricionais únicos e propriedades nutraceuticas (Saunders, 1990). Numerosos compostos nutraceuticos primários extraídos de farelo de arroz contêm altos níveis de fitoquímicos com potenciais atividades antioxidantes. Estes fitoquímicos incluem α , β , γ , δ -tocoferol, tocotrienóis (vitamina E) (Jariwalla, 2001) e γ -orizanol (Akihisa et al., 2000).

2.2.5. Benefícios para a saúde do farelo de arroz

Tem-se assistido a um interesse crescente no uso de antioxidantes naturais em especial nos fenólicos, dadas as suas propriedades benéficas para a saúde, associadas à redução no desenvolvimento de doenças crónicas relacionadas com o *stress* oxidativo (Moon e Shibamoto, 2009).

Nessa perspetiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores que ajudam o corpo humano na redução de danos oxidativos. Os fitoquímicos são classificados como compostos bioativos

provenientes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas, e estão relacionados com a redução do risco de ocorrência de várias doenças crónicas, nomeadamente vários tipos de cancro.

A casca e o farelo, como anteriormente referido, são as camadas protetoras do grão de arroz, que protegem os materiais internos, tendo na sua composição compostos bioativos com função protetora como os antioxidantes, maioritariamente compostos fenólicos. É reconhecido no sector alimentar que diversos componentes fitoquímicos presentes no farelo de arroz possuem diversos benefícios promissores para a saúde (Jariwalla, 2001). Alguns dos importantes componentes bioativos presentes no farelo de arroz estão presentes na Tabela II.2.

Tabela II. 2. Componentes bioativos presentes no farelo de arroz e respetiva atividade biológica para a saúde humana (Adaptado e modificado de Borresen & Ryan, 2014).

Componentes bioativos presentes no farelo de arroz	Exemplos	Atividade Biológica
Lípidos Insaponificáveis (γ-orzanol)	Combinação de ácido ferúlico, ésteres de esterol e álcoois triterpenos	Antibacteriano Antioxidante Redução absorção de colesterol Quimioprevenção do cancro
Vitamina E	α-Tocoferol, γ-Tocoferol, tocotrienóis	Quimioprevenção do cancro Antibacteriano Antioxidante Redução absorção de colesterol
Polifenóis	Ácido Ferúlico, ácido α-lipóico, ácido cafeico, ácido salicílico	Antioxidante Efeito anti proliferativo de doenças cancerígenas Antibacteriano Anti-inflamatório
Fitoesteróis	β-sitosterol, campesterol, estigmasterol	Redução absorção de colesterol Anti-inflamatório Antioxidante Estimula a proliferação de linfócitos Quimioprevenção do cancro
Aminoácidos	Lisina	Crescimento e evolução Hipoalergenicidade

O farelo de arroz estabilizado, bem como o óleo de farelo de arroz, apresentam alto conteúdo de ácidos gordos (oleico e linoleico) quando comparado com outros cereais, e uma vasta variedade de componentes bioativos como, o ácido ferúlico, o β -sitosterol, γ -orizanol e tocotrienóis/tocoferóis (Henderson et al., 2012). Associado a estes componentes, diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e epidemiológicos evidenciam diversos benefícios para a saúde, fundamentalmente, na prevenção e controlo de doenças crónicas (Dipti et al., 2012). Em particular, estudos com o γ -orizanol, uma combinação de ésteres de ácido ferúlico, álcoois triterpenos e esterol, indicam que estes compostos são benéficos para a saúde, nomeadamente pelas suas propriedades atividade antioxidantes (Duve & White, 1991) e pela capacidade de redução dos níveis de colesterol no sangue (Seetharamaiah & Chandrasekhara, 1989). Em ensaios com modelos animais, estes compostos demonstraram capacidade de inibição do crescimento de tumores (Yasukawa et al., 1998). Contudo, o mecanismo de ação destes componentes bioativos presentes no farelo ainda não é claro e evidente. Alguns estudos sugerem que o farelo de arroz quando introduzido na dieta pode exercer efeitos benéficos contra vários tipos de cancro, como cancro da mama, pulmão e fígado (Henderson et al., 2012). Os efeitos anticancerígenos evidenciados dos componentes bioativos do farelo de arroz são mediados através da capacidade destes para induzir apoptose, inibir a proliferação celular, alterar o ciclo celular e a progressão de células cancerígenas e proteger contra danos nos tecidos, através de agentes oxidantes e o bloqueio de respostas inflamatórias crónicas (propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias) (Islam et al., 2011; Borresen & Ryan, 2014).

Os componentes bioativos têm vindo ainda a demonstrar capacidade de diminuição do risco da diabetes tipo II (Cheng et al., 2010), da regulação do metabolismo de lípidos (Kahlon et al., 1996; Most et al., 2005) e do controlo metabólico de doenças cardiovasculares (Cicero e Derosa, 2005).

Outro efeito benéfico do farelo de arroz consiste na redução dos níveis de colesterol em animais e humanos com hipercolesterolemia (Seetharamaiah e Chandrasekhara, 1989; Kahlon et al., 1990; Saunders, 1990; Kahlon et al., 1991; Rukmini e Raghuram, 1991; Hegsted et al., 1993). Um mecanismo sugerido para o efeito da redução de colesterol pelo farelo de arroz é a redução da absorção e o aumento da excreção de lípidos, colesterol e ácidos biliares. No entanto, não é atribuído um papel significativo na redução de colesterol à fibra solúvel. Estudos em humanos sugerem que a redução dos níveis de colesterol plasmático só é observável em indivíduos com hipercolesterolemia, no entanto, em indivíduos que apresentam níveis de colesterol normal o mesmo já não se observa (Friedman, 2013).

O farelo contém ainda cerca de 10 a 15% de proteínas de alta qualidade que apresentam propriedades únicas hipoalergénicas e anticancerígenas, superiores às proteínas dos cereais (Fabian e Ju, 2011). As proteínas do farelo contém ainda aminoácidos, essencialmente a lisina que apresenta propriedades nutracêuticas únicas (Saunders, 1990) e tem vindo a servir de ingrediente, na sua forma isolada, em muitos produtos alimentares (Wang et al., 1999).

2.2.6. Aplicações do farelo de arroz

As aplicações do farelo de arroz têm sido cada vez mais surpreendentes e diversificadas. Inicialmente a utilização de farelo de arroz “não estabilizado” estava reduzida à alimentação animal. Nos últimos 20 anos foram significativas as melhorias nos métodos de estabilização do farelo, o que permitiu a existência de novas e inovadoras áreas de aplicação (Mazza, 1998). Estas novas áreas surgem devido aos seus efeitos benéficos tanto a nível biológico como nutricional que têm sido identificados e faz com que o farelo de arroz tenha começado a ganhar importância a nível comercial (Wani et al., 2015).

Apesar dos avanços e das descobertas feitas em torno deste subproduto mal aproveitado da indústria arroseira, este não é inserido diretamente numa dieta para consumo humano pois contém alto teor de fibra e, possivelmente, resíduos de casca. Esta não é aconselhada para alimentação humana dados os altos valores de cinza e lenhina presentes na sua constituição (Salanti et al., 2010).

No entanto, hoje em dia, a sua utilização, numa visão mais comercial, tem passado essencialmente pela produção de óleo comestível, OFA, pela produção de fertilizantes e pela extração de diversos componentes com atividade biológica para posterior incorporação, principalmente antioxidantes e proteínas, servindo de aditivo em alguns produtos alimentares, bem como, sob a forma de nutracêuticos para as indústrias farmacêutica e cosmética (Wani et al., 2015; Prasad et al., 2011).

2.2.6.1. Suplementação de farelo de arroz no desenvolvimento de produtos funcionais

Uma série de estudos têm sido levados a cabo com o propósito de avaliar se o farelo de arroz é realmente um produto funcional, quando incorporado a diversos alimentos, enriquecendo a qualidade nutricional destes. Tendo em vista o seu potencial terapêutico, a sua adição pode contribuir para o desenvolvimento de alimentos de valor

acrescentado ou alimentos funcionais, que atualmente apresentam uma grande procura. Pelo que o uso de frações da fibra de farelo de arroz e de farelo desengordurado apresentam grande potencial no desenvolvimento de produtos de panificação (Hu et al., 2009). O farelo estabilizado bem como alguns dos seus componentes têm sido utilizados para fins nutricionais e funcionais como aditivos/suplementos em diversos produtos alimentares como pão (Hu et al., 2009), bolachas (Younas et al., 2011), pizza (de Delahaye et al., 2005), bebidas (Faccin et al., 2009), carne moída (Shih & Daigle, 2003) e leite em pó (Nanuna, 2000).

Para além dos benefícios fisiológicos associados ao farelo, este como alimento rico em fibra, principalmente fibra insolúvel, que apresenta uma boa capacidade de retenção de água, pode permitir trazer textura, propriedades gelificantes, espessantes, emulsionantes e estabilizantes para certos produtos alimentares (Dreher, 1987; Sharma, 1981). Nomeadamente, em produtos de panificação, a grande capacidade de retenção de água do farelo de arroz permite aos produtos manterem a humidade e frescura (Malekian et al., 2000).

No entanto, a adição de farelo de arroz no desenvolvimento de produtos funcionais ainda se encontra na sua fase inicial apesar dos diversos estudos têm sido feitos nesta área (Wani et al., 2015).

2.2.7. Futuro potencial do farelo de arroz

Os componentes do farelo de arroz como o óleo, a proteína, as fibras alimentares e os fitoquímicos oferecem um elevado valor nutricional ao farelo. Mesmo assim, o farelo de arroz ainda é consumido em pequena escala pelo homem. Em contraste, com um outro produto proveniente da indústria de arroz, o arroz integral que apresenta na sua constituição as camadas exteriores do grão, nas quais se encontra o farelo, este alimento ainda não foi muito aceite por parte dos consumidores devido à sua textura mais rija e gosto “mais integral”.

Deste modo a introdução de farelo de arroz e as suas frações em produtos já existentes poderá ser uma abordagem promissora, permitindo que os consumidores de uma forma mais disfarçada consumam componentes bioativos e nutrientes saudáveis provenientes do farelo (Borresen & Ryan, 2014). Foram efetuadas fortificações de alimentos de desmame com farelo de arroz por alguns investigadores (Khan et al, 2011) devido aos seus conteúdos em proteína e gorduras únicas, facilidade de digestão e propriedades hipoalergénicas. É necessário fazer mais investigação de modo a tornar

esta tendência em oportunidades promissoras (Borresen & Ryan, 2014). Recentemente, investigação em alimentação tem tentado estudar o farelo de arroz de valor agregado, de modo a utilizar eficazmente o máximo de componentes saudáveis. As fibras solúveis têm sido cada vez mais aplicadas na formulação de comida devido às suas propriedades físico-químicas e benefícios para a saúde em comparação com fibras insolúveis.

A popularidade dos novos produtos de farelo de arroz é expectável que continue a aumentar com o maior número de consumidores de comida saudável. É necessário incentivar as indústrias produtoras de arroz a aumentarem a produção e disponibilidade de farelo de arroz estabilizado, e a sua incorporação em produtos mais saudáveis para o consumidor.

2.3. Avaliação *in vivo* da ingestão de farelo de arroz

O farelo de arroz apresenta elevado valor nutricional e diversos estudos em animais e humanos evidenciam que o seu consumo poderá estar associado à prevenção e controlo de doenças crónicas, redução dos níveis de colesterol, associado aos componentes bioativos (γ -orizanol e tocotrienóis) presentes no farelo e nas suas frações (Dipti et al., 2012).

Do ponto de vista alimentar, e com o propósito de avaliar o potencial da inserção de farelo de arroz na dieta humana, diversos estudos utilizando modelos animais necessitam de ser feitos, quer a nível de segurança quer a nível de funcionalidade do produto alimentar. Como tal, devem ser tidos em conta ensaios toxicológicos, que são relevantes para auxiliar na comprovação da segurança de alimentos pois contribuem para a identificação de efeitos adversos potenciais e avaliação da relação dose-resposta para os efeitos adversos. Adicionalmente, para o estudo das ações benéficas e valor funcional, vários ensaios podem ser usados, nomeadamente para avaliar o efeito nos níveis de colesterol, a atividade antioxidante, anti-inflamatória, pré-biótica e anticancerígena.

Na literatura estão descritos numerosos modelos que podem ser utilizados para os estudos dos efeitos observáveis para o farelo de arroz. Dado que os modelos de avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade (dose única e dose múltipla), deteção de possíveis alterações nos níveis de colesterol plasmático, avaliação do efeito antioxidante no modelo animal de *stress* oxidativo induzido pelo etanol e avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação foram utilizados nesta dissertação, os mesmos serão apresentados com algum detalhe:

Avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade (dose única e múltipla)

A toxicologia alimentar constitui uma subárea da toxicologia que apresenta uma enorme importância para a saúde humana. Tem como objetivo analisar e definir quais os alimentos que possuem ou não potencial de causar efeitos adversos após a sua ingestão. A toxicidade de um alimento ocorre devido à presença de compostos prejudiciais presentes no mesmo, que podem causar danos à saúde dos seres vivos, estando diretamente relacionada com diversas condições, tais como: exposição à substância, a sua natureza, concentração no alimento, frequência de ingestão, via de introdução no organismo e suscetibilidade individual (Midio & Martins, 2000).

Os animais de laboratório têm sido utilizados como modelos para a avaliação toxicológica de diversas substâncias, no sentido de determinar com exatidão os efeitos adversos existentes ou não da exposição a uma substância em estudo (Cruz, 2003). Para tal, neste tipo de ensaios define-se um grupo de controlo, em que a substância em estudo não será administrada, permitindo assim uma comparação entre grupos para conclusões finais. E fundamentalmente, os animais deverão ser observados diariamente, registando-se o consumo de água e ração, o seu peso, e identificar qualquer alteração comportamental. No final do ensaio, todos os animais sobreviventes ao tempo de experimentação são submetidos ao sacrifício e, analisados de acordo com uma matriz de parâmetros bioquímicos e histológicos para que se possa determinar com exatidão os efeitos adversos existentes ou não da substância em estudo.

Em geral, a pesquisa toxicológica tenta manter constantes todas as variáveis, como seleção da espécie animal, idade, sexo, dieta durante o ensaio, exceto a exposição de produtos químicos a serem testados. Assim, qualquer alteração no grupo experimental é assumida como sendo perturbação causada pela exposição ao produto. Portanto, a maioria dos estudos toxicológicos, utiliza uma variedade de doses de uma certa substância para determinar os limites tóxicos do componente. Um componente importante da investigação toxicológica é a relação dose-resposta. As experiências com animais para determinar as relações dose-resposta de um composto medem a extensão de qualquer efeito observado em várias doses, permitindo assim determinar uma dose que não revelará nenhum efeito tóxico. Esta informação é útil na compreensão dos mecanismos de toxicidade e os dados permitem extrapolar os efeitos nos modelos animais para o homem (Rodríguez et al., 2001).

Todas as formas de extrapolação são meramente especulativas porque se baseiam apenas em modelos preditivos para que cumpram as diretrizes definidas pelas diferentes agências reguladoras, garantindo deste modo a proteção do ser humano

perante as propriedades toxicológicas de cada substância presente no meio ambiente, nos alimentos ou nos medicamentos (Bessems e Geraets, 2013).

Avaliação do efeito dos níveis de colesterol plasmático

A síntese de colesterol é um processo fisiológico vital, uma vez que esta molécula é um componente essencial das membranas celulares e é precursora de hormonas esteroides e de vitamina D. Quase todos os tecidos podem sintetizar colesterol, no entanto, a maior parte da síntese ocorre no fígado, no intestino e no sistema nervoso central (Durrington e Sniderman, 2004).

A concentração do colesterol plasmático é regulada pelas vias endógena e exógena do metabolismo do colesterol. Pela via endógena, o colesterol é sintetizado pelo fígado e pelos tecidos extra-hepáticos. Pela via exógena, o colesterol proveniente da dieta e de fontes biliares é absorvido no intestino. Qualquer alteração em alguma destas vias implica uma alteração na concentração do colesterol plasmático (Shepherd, 2001).

O colesterol proveniente do fígado pode ser secretado na vesícula biliar ou pode ser incorporado, na sua forma livre ou esterificada, em lipoproteínas, como por exemplo as lipoproteínas de elevada densidade (HDL – do inglês *High-Density Lipoproteins*), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL - do inglês *Low Density Lipoproteins*) e as de muito baixa densidade (VLDL – do inglês *Very-Low-Density Lipoproteins*). Estas lipoproteínas transportam, assim, o colesterol do fígado para o plasma. Níveis elevados de colesterol no fígado levam a um aumento da produção de VLDL e/ou LDL e a uma diminuição da regulação do recetor LDL (Shepherd, 2001). Quando a produção e a absorção de colesterol são superiores à sua excreção, os níveis plasmáticos aumentam, o que corresponde a hipercolesterolemia, um dos principais fatores de risco no aparecimento de doenças cardiovasculares de natureza aterosclerótica (Durrington e Sniderman, 2004).

Neste tipo de estudos, os animais mais utilizados são geralmente os ratos e os murganhos, uma vez que ao sofrerem uma modificação na dieta, respondem de uma forma semelhante aos seres humanos. Além disso, nos ratos e seres humanos é referido ainda que apresentam semelhantes níveis significativos de colesterol plasmático e intrinsecamente baixa taxa de síntese hepática de colesterol circulante (Spady e Dietschy, 1985).

Avaliação do efeito antioxidante no modelo animal de stress oxidativo induzido pelo álcool

A avaliação de biomarcadores de *stress* oxidativo de um indivíduo assume hoje em dia uma importância crescente já que têm vindo a ser estabelecidas associações entre os sistemas de defesa antioxidante e um grande número de doenças crónicas, inflamatórias, neurodegenerativas, autoimunes, diabetes, entre outras, e mesmo em condições fisiológicas como o envelhecimento (Reguengo, 2010). Em condições fisiológicas o organismo produz permanentemente, a partir do oxigénio e a nível da mitocôndria, “espécies reativas de oxigénio” (ROS - do inglês Reactive Oxygen Species).

As funções das ROS são muito vastas, e desempenham um papel relevante na proteção do organismo contra agentes externos. No entanto a sua produção excessiva ou não controlada é nefasta e leva ao *stress* oxidativo (McKee, 1999), ou seja, apesar da contribuição fundamental para os mecanismos de defesa celular, podem ter um efeito prejudicial para o organismo, se existir um aumento ou uma diminuição excessiva na produção de antioxidantes (Oliveira e Schoffen, 2010).

Os organismos são providos de um sistema de defesa antioxidante que tem como função inibir ou reduzir os danos causados pela ação nefasta das ROS. O sistema referido pode dividir-se em dois grandes grupos, ou seja, num sistema enzimático, do qual fazem parte a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase (Hsieh et al., 2014) e num sistema não enzimático onde estão contempladas substâncias que tanto podem ser de origem endógena, como dietética, e onde as vitaminas, minerais e compostos fenólicos estão em destaque (Oliveira e Schoffen, 2010). O mecanismo de ação pelo qual atua esta defesa antioxidante pode ser de dois tipos diferentes, ou seja, pode atuar impedindo a formação de ROS, impedindo a sua ação, ou então, pode atuar favorecendo a reparação ou reconstituição das estruturas biológicas lesadas (Barbosa et al., 2010).

Assim, torna-se relevante definir o que se entende por substância antioxidante. Esta tem a capacidade de reduzir, proteger ou prevenir a expansão de danos oxidativos, inativando ou prevenindo a geração de danos induzidos pelas ROS (Oliveira e Schoffen, 2010). Diversos estudos referem que os antioxidantes naturais, dadas as suas propriedades benéficas para a saúde, são eficazes na prevenção de doenças hepáticas relacionadas com *stress* oxidativo através de interações específicas e sinergias (Vitaglione et al., 2004). O farelo de arroz, como foi referido anteriormente, apresenta

na sua composição compostos bioativos com função protetora como os antioxidantes, nomeadamente orizanol, vitamina E, polifenóis e fitosteróis.

A literatura disponível refere clara e extensivamente a capacidade do etanol para alterar dramaticamente várias funções fisiológicas, endócrinas e comportamentais (Froy, 2007). Entre outros efeitos foi já referido que o consumo crónico de etanol é capaz de induzir *stress* oxidativo quer através da produção de ROS quer através da diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos (Colantoni et al., 2000).

Neste modelo em análise, e para que se possa obter respostas num período de tempo razoavelmente curto, o *stress* oxidativo nos animais foi induzido através da administração repetida de etanol, que por sua vez, permitiu o aumento de produção de ROS, isto porque, quando a produção de ROS supera a defesa antioxidante encontramos numa situação de *stress* oxidativo. E com isto, permite-nos avaliar o efeito antioxidante do farelo de arroz através da avaliação do comportamento de biomarcadores de *stress* oxidativo, como AST, ALT, ALP e Gama-GT. As duas primeiras, AST e ALT, são marcadores fiáveis para a função hepática. E encontra-se estabelecido que o AST pode ser encontrado no fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, rim, cérebro, pâncreas, pulmões, enquanto o ALT está presente no fígado. Se a atividade destas enzimas AST, ALT, ALP e Gama-GT apresentar elevados níveis, indica-nos permeabilidade e danos nos tecidos ou a necrose de hepatócitos (Hsieh et al., 2014).

Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação

Atualmente, a inflamação é reconhecida como um processo bioquímico e celular que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, envolvendo o plasma, as células circulantes, os vasos e os constituintes celulares e extracelulares desse tecido. Esse processo tem como objetivo destruir, diluir ou isolar o agente lesivo e, também, induzir uma série de eventos que contribuem para a cicatrização e reconstituição do tecido lesado. Em resumo, a inflamação é, na maioria das vezes, uma resposta protetora cuja função é libertar o organismo da causa inicial da lesão celular e das consequências dessa lesão (Collins, 1999; McCance e Huether, 1998). O processo inflamatório pode ser destrutivo para os tecidos quando ativado repetidamente ou inapropriadamente, estando associado a doenças como artrite reumatóide, asma, aterosclerose, cancro entre outras (Nordqvist, 2015).

A inflamação pode-se manifestar-se como um processo agudo ou crônico. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, de minutos, de horas, ou de alguns dias, e as suas principais características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema), migração celular e sensibilização ou ativação dos nociceptores. Essa resposta pode ser causada por trauma mecânico, privação de oxigênio ou nutrientes, alterações imunológicas ou genéticas, agentes químicos, microrganismos, temperaturas extremas ou radiação. Por outro lado, a inflamação crônica é de longa duração e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (McCance e Huether, 1998; Ryan & Majno, 1977; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

As descobertas das alterações associadas à resposta inflamatória, dos mediadores envolvidos no estabelecimento dessas alterações, bem como dos medicamentos com atividade anti-inflamatória têm sido possíveis em função da existência de vários modelos experimentais. Esses modelos podem diferir entre si quanto às células e aos mediadores envolvidos, às alterações observadas, à duração e magnitude das alterações e à recuperação da função tecidual. Diferentes substâncias de natureza exógena ou endógena podem ser usadas para induzir inflamação aguda ou crônica em modelos animais. O modelo de inflamação induzida pelo carragenano, um polissacárido sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas da ordem *Gigartinales*, foi originalmente proposto por Winter, Risley & Nuss (1962). Tornou-se um modelo muito utilizado e permitiu determinar o papel de vários mediadores de inflamação importantes, bem como a identificação de medicamentos potencialmente anti-inflamatórios.

III. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Amostras a testar

As amostras de farelo de arroz agulha utilizadas para este estudo foram de dois tipos, ambos provenientes da empresa NovaArroz, Produtos Alimentares SA (Oliveira de Azeméis, Portugal):

- a) Farelo de arroz estabilizado, cuja estabilização enzimática foi efetuada através de um processo térmico (binómio tempo/temperatura) previamente otimizado pela empresa.
- b) Farelo de arroz desengordurado, através de um processo de extração por solventes.

Reagentes

Ao solução de Formalina a 10% tamponada a pH 7,4. A indometacina e o carragenano foram adquiridos à Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A Glucose a 30%, 30 mg/mL de solução injetável foi adquirida à B.Braun Medical, Lda (Queluz de baixo, Portugal).

Os restantes reagentes e solventes utilizados eram de grau analítico.

Animais

Foram utilizados 50 murganhos machos, espécie *Mus musculus* da estirpe CD1, com pesos de 25-30g, e 80 ratos Wistar machos, com peso aproximado de 250 g, ambos adquiridos à Charles River (Saint-Germain-Nuelles, França).

Durante o ensaio os animais tiveram uma dieta de manutenção para roedores para períodos curtos e longos (Ultragene, Santa Comba Dão, Portugal) em regime *ad libitum*. A água fornecida também em regime *ad libitum* foi acidificada a pH 2.

Os animais foram mantidos em condições padronizadas de temperatura (22-25°C), humidade relativa (40-60%) e ciclo de luz-obscuridade (12h/12h).

Todos os ensaios envolvendo experimentação animal foram realizados no Biotério da Faculdade de Farmácia/Universidade de Lisboa, com a permissão da Comissão de Ética Animal local, e de acordo com a diretiva 2010/63/UE de 22 de Setembro e do DL 113/2013. O protocolo experimental foi submetido à Direção Geral de Alimentação e Veterinária para autorização.

3.2 Métodos

3.2.1 Tratamento prévio do farelo

Para que fosse possível a administração por via oral através de sonda gástrica foi necessário proceder a um tratamento prévio dos dois tipos de farelo em estudo, que posteriormente foram suspensos em água. Após vários testes de passagem do farelo pela sonda gástrica, as condições otimizadas para os farelos foram a sua prévia pulverização em almofariz seguida de tamisação. O farelo desengordurado foi pulverizado em almofariz e tamisado por tamis de 180 μm e o farelo estabilizado foi pulverizado e tamisado por tamises de 180 e 125 μm .

3.2.2. Avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações do colesterol plasmático (Dose única)

Este ensaio teve por base o estudo feito por Sampayo et al. (Sampayo et al., 2013). Foram utilizados 25 murganhos com pesos de 25-30g, divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais. Foi administrado oralmente, por sonda gástrica, uma dose única das duas amostras a duas doses diferentes de suspensão de farelo de arroz: **Amostra 1**, “Farelo de arroz Desengordurado”; **Amostra 2**, “Farelo de arroz Estabilizado”; **dose 1** correspondente a 500 mg/kg (peso vivo); **dose 2** correspondente a 250 mg/kg (peso vivo).

3.2.2.1. Esquema de tratamento

Todos os animais que integraram o estudo foram monitorizados durante 7 dias prévios à administração (Dia -7). Foi realizada apenas uma administração (Dia 0), e o sacrifício ocorreu 7 dias após a administração (Dia 7), que correspondeu a 15 dias após o início do estudo (Figura III.1).



Figura III. 1. Cronograma do ensaio de avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações no colesterol plasmático (Dose única).

3.2.2.2. Preparação das amostras dos farelos para administração

Nos dias da administração, para os dois tipos de farelo, após terem passado por processos de pulverização e tamisação, foram preparadas suspensões com volume total de 5 mL. Para tal, pesou-se 0.222g para a dose mais elevada (500 mg/kg) e 0.141g para a dose mais baixa (250 mg/kg) e fez-se o volume final de 5 mL com água.

3.2.2.3. Administração das amostras dos farelos

As amostras preparadas tal como descrito no ponto 3.2.2.1.2. foram administradas a cada animal por via oral com sonda gástrica num volume de 0,2 mL.

3.2.2.4. Monitorização ao longo do ensaio

Para estabelecimento do comportamento de referência dos animais e de despiste de qualquer anomalia não atribuível ao estudo, a monitorização dos animais teve início 7 dias (Dia -7) antes da administração dos dois tipos de farelo, tendo sido registado o peso individual de cada animal, o peso das fezes coletadas das camas de cada gaiola e as quantidades de ração e de água consumidas em cada gaiola. Igual procedimento foi realizado nos sete dias que sucederam a única administração (Dia 0). Foi ainda realizada, diariamente, durante o período do ensaio, a observação relativa aos sinais de morbilidade e mortalidade dos animais.

3.2.2.5. Recolha de amostras e análise macroscópica

No Dia 7 do estudo, aos animais anestesiados com isoflurano foi recolhido sangue da cavidade ocular. As amostras de sangue (cerca de 1 mL) foram recolhidas em tubos de hemograma com EDTA (K3-K3E da Normax). Após o sacrifício, procedeu-se à necrópsia completa de todos os animais, retirando-se o fígado, baço, rins e coração de cada animal. Os órgãos foram imediatamente analisados macroscopicamente e lavados com KCl a 0,154 M. O excesso de KCl foi removido com papel de filtro e, posteriormente, os órgãos foram pesados e fixados em formalina a 10% tamponada a pH 7,4 e encaminhados para a análise histopatológica.

A partir das amostras de sangue recolhidas foram analisados o hemograma, o leucograma, a albumina, a proteína total, o volume globular médio (V.G.M), a hemoglobina globular média (H.G.M), as plaquetas, (volume plaquetário médio (MPV), o índice de dispersão plaquetário (PDW), o colesterol total, a bilirrubina total, a

transaminase glutâmico-oxalacética sérica (G.O.T/AST), a transaminases (T.G.P/ALT), a fosfatase alcalina e ainda a gama-glutamilttransferase (GGT) e a desidrogenase láctica (LDH) (ver 3.2.6.).

3.2.3. Avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações do colesterol plasmático (Dose Múltipla)

Para este estudo foram utilizados 25 murganhos com pesos de 25-30 g, divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais. As duas amostras de suspensão de farelo de arroz em duas doses diferentes foram administradas oralmente, por sonda gástrica, repetidamente, de acordo com o esquema da Figura III.2: **Amostra 1**, “Farelo de arroz Desengordurado”; **Amostra 2**, “Farelo de arroz Estabilizado”; **dose 1** correspondente a 500 mg/kg (peso vivo); **dose 2** correspondente a 250 mg/kg (peso vivo).

3.2.3.1. Esquema de tratamento

No estudo da dose múltipla foram efetuadas 6 administrações de suspensão de farelo de arroz a vinte e cinco animais. À semelhança da dose única, nos 7 dias antes da primeira administração (Dia -7) os animais foram monitorizados, tendo sido feita a primeira administração ao Dia 0 e a sexta e última administração ao Dia 11. Os animais foram eutanasiados ao Dia 14, após o início do estudo. (Figura III.2).

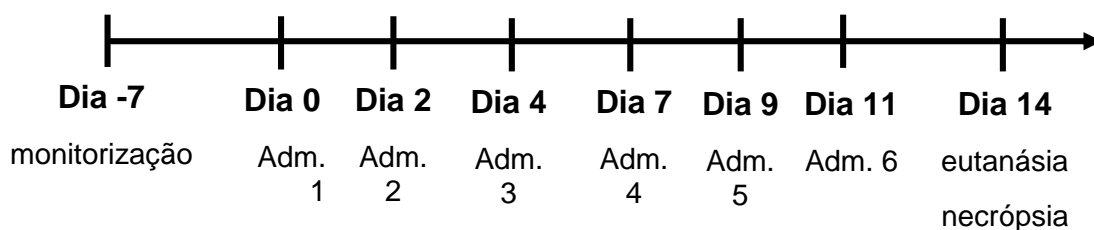


Figura III. 2. Cronograma do ensaio de avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade e alterações do colesterol plasmático (Dose múltipla).

3.2.3.2. Preparação das amostras dos farelos para administração

As amostras foram preparadas como descrito em 3.2.2.2.

3.2.3.3. Administração da amostra dos farelos

As amostras foram administradas como descrito no ponto 3.2.2.3 e de acordo com esquema da Figura III.2.

3.2.3.4. Monitorização ao longo do ensaio

Para estabelecimento do comportamento de referência dos animais e de despiste de qualquer anomalia não atribuível ao estudo, a monitorização dos animais teve início 7 dias (Dia -7) antes da administração dos dois tipos de farelo, tendo sido registado o peso individual de cada animal, o peso das fezes coletadas das camas de cada gaiola e as quantidades de ração e de água consumidas em cada gaiola. Igual procedimento foi realizado nos 15 dias que sucederam a primeira administração (Dia 0). Foi ainda realizada, diariamente, durante o período do ensaio, a observação relativa aos sinais de morbilidade e mortalidade dos animais.

3.2.3.5 Recolha de amostras e análise macroscópica

Procedeu-se tal como em 3.2.2.5.

3.2.4. Avaliação do efeito antioxidante no modelo animal de *stress* oxidativo induzido pelo álcool

Este modelo tem por base o modelo animal de *stress* oxidativo descrito por Pari e Suresh (Pari & Suresh, 2008) e Hsieh, Yeh, Lee e Huang (Hsieh et al., 2014).

Neste ensaio foram utilizados 44 ratos Wistar, machos, com pesos de 250-320 g, divididos aleatoriamente em 8 grupos. No **Grupo I** (grupo controlo) aos animais foi administrado, por via oral (sonda gástrica), 1 mL de uma solução de glucose a 30% (p/v); no **Grupo II** (segundo grupo controlo) foi administrado 1 mL de suspensão de farelo de arroz desengordurado na dose mais alta; no **Grupo III** (terceiro grupo controlo) foi administrado 1 mL de suspensão de farelo de arroz estabilizado na dose mais alta; e no **Grupo IV** (quarto grupo controlo) foi administrado 1 mL de solução etanol. Todas as administrações foram efetuadas por via oral (sonda gástrica) e cada um dos grupos controlo foi constituído por 5 animais (n=5).

Foram ainda incluídos no estudo quatro grupos de animais, constituídos por 6 animais cada: **Grupo V** – aos quais foi administrado 1 mL de suspensão de farelo de arroz desengordurado na dose mais elevada e 0,5 mL de solução de etanol; **Grupo VI** – aos

quais foi administrado 1 mL de suspensão de farelo de arroz desengordurado na dose mais baixa e 0,5 mL de solução de etanol; **Grupo VII** – aos quais foi administrado 1 mL de suspensão de farelo de arroz estabilizado na dose mais elevada e 0,5 mL de solução de etanol; **Grupo VIII** – aos quais foi administrado 1 mL de suspensão de farelo de arroz estabilizado na dose mais baixa e 0,5 mL de solução de etanol. Todas as administrações foram efetuadas por via oral (sonda gástrica). No decurso do ensaio a concentração da solução de etanol aumentou de acordo com o valor indicado na Tabela III.1.

3.2.4.1 Esquema de tratamento

O ensaio teve a duração de 30 dias, tendo sido feitas duas avaliações por semana, onde foi registado o peso dos animais e a observação relativa aos sinais de morbilidade e mortalidade. No Dia 30 do ensaio foi feita a última avaliação e, após a colheita de sangue, os animais foram eutanasiados (Tabela III.1).

Tabela III. 1. Esquema de tratamento do ensaio de avaliação do efeito antioxidante no modelo animal de *stress* oxidativo induzido pelo etanol

		Semana	1							2							3							4							5	
		Dia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
		Avaliação	X			X				X			X				X			X				X			X					X
Grupos	I	Glucose 30%	X	X	X	X	X			X	X		X	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X	X				
	II	Farelo Desengordurado (500 mg/kg)	X	X	X	X	X			X	X		X	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X	X				
	III	Farelo Estabilizado (500 mg/kg)	X	X	X	X	X			X	X		X	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X	X				
	IV	Etanol (%)	20	20	20	20	20			30	30		30	30			40	40	40	40	40			50	50	50	50	50				
	V	Farelo desengordurado (500 mg/kg)	X	X	X	X	X			X	X		X	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X	X				
		Etanol (%)	20	20	20	20	20			30	30		30	30			40	40	40	40	40			50	50	50	50	50				
	VI	Farelo desengordurado (250 mg/kg)	X	X	X	X	X			X	X		X	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X	X				
		Etanol (%)	20	20	20	20	20			30	30		30	30			40	40	40	40	40			50	50	50	50	50				
	VI I	Farelo Estabilizado (500 mg/kg)	X	X	X	X	X			X	X		X	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X	X				
		Etanol (%)	20	20	20	20	20			30	30		30	30			40	40	40	40	40			50	50	50	50	50				
	VI II	Farelo Estabilizado (250 mg/kg)	X	X	X	X	X			X	X		X	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X	X				
		Etanol (%)	20	20	20	20	20			30	30		30	30			40	40	40	40	40			50	50	50	50	50				

3.2.4.2. Preparação da solução de etanol

O etanol absoluto foi diluído para as concentrações de 20, 30, 40, 50 % (v/v) com água destilada.

3.2.4.3. Preparação das amostras dos farelos para administração

Nos dias em que se procedeu à administração, os dois tipos de farelos, após terem passado por processos de pulverização e tamisação, foram suspensos em água destilada. Para tal, pesou-se 3 g para a dose mais elevada (500 mg/kg) e 1,5 g para a dose mais baixa (250 mg/kg) e fez-se o volume final de 10 mL com água.

3.2.4.4. Recolha de amostras e análise macroscópica

Os animais foram anestesiados com isoflurano. As amostras de sangue foram recolhidas por punção cardíaca, para eppendorfs, deixadas a coagular à temperatura ambiente durante 30min e, posteriormente, foram centrifugadas a 12 000x g, durante 15 min, para obtenção de soro para as análises bioquímicas. Os animais foram sacrificados, e os tecidos de interesse dissecados (fígado, baço e rins). Os órgãos recolhidos foram analisados macroscopicamente e lavados com KCl a 0,154 M. Após remoção do excesso de KCl com papel de filtro, os órgãos foram pesados e fixados em formalina tamponada a pH 7,4 para posteriores estudos histopatológicos.

Os estômagos foram também recolhidos, cortados ao longo da grande curvatura e lavados com a solução de KCl a 0,154 M. Posteriormente, foram observados macroscopicamente para identificação de lesões e a superfície da mucosa gástrica foi fotografada. Seguidamente foram fixados em formalina tamponada a pH 7,4 para posteriores estudos histopatológicos.

A avaliação da actividade antioxidante foi feita por determinação da atividade de Bilirrubina, AST, ALT, ALP e GGT no soro complementada pela análise histopatológica dos tecidos selecionados (ver 3.2.6.5; 3.2.6.6; 3.2.6.7; 3.2.6.8).

3.2.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação

O modelo de inflamação induzida pelo carragenano é o mais adequado para avaliar as propriedades anti-inflamatórias e o efeito antiedematoso de medicamentos/produtos. Este ensaio teve por base o modelo de inflamação induzida pelo carragenano descrito por Amdekar et al. (Amdekar et al., 2012).

Para este ensaio foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com peso aproximado de 200 g, distribuídos por seis grupos experimentais, sendo cada grupo constituído por 6 animais ($n = 6$).

A inflamação foi induzida na pata posterior direita do animal por injeção subplantar na região posterior direita de 0,1 mL de carragenano a 1%. O primeiro grupo de animais foi apenas induzido não tendo sido alvo de qualquer tratamento (**GI** - Controlo negativo), tendo somente recebido água por sonda gástrica. O segundo grupo recebeu uma injeção subcutânea de 10 mg/kg de indometacina, 30 minutos antes da indução com o carragenano (**GII** – Controlo positivo). Ainda trinta minutos antes da indução da inflamação, quatro grupos de 6 animais receberam por sonda intragástrica duas amostras com duas doses diferentes de suspensões de farelo de arroz: **GIII** – “Farelo desengordurado” dose 1 (500 mg/kg); **GIV** – “Farelo desengordurado” dose 2 (250 mg/kg); **GV** – “Farelo Estabilizado” dose 1 (500 mg/kg); **GVI** – “Farelo Estabilizado” dose 2 (250 mg/kg).

3.2.5.1. Esquema de tratamento

O esquema do tratamento encontra-se representado na Figura III.3. As administrações aos diferentes grupos de animais fez-se 30 minutos antes da indução.

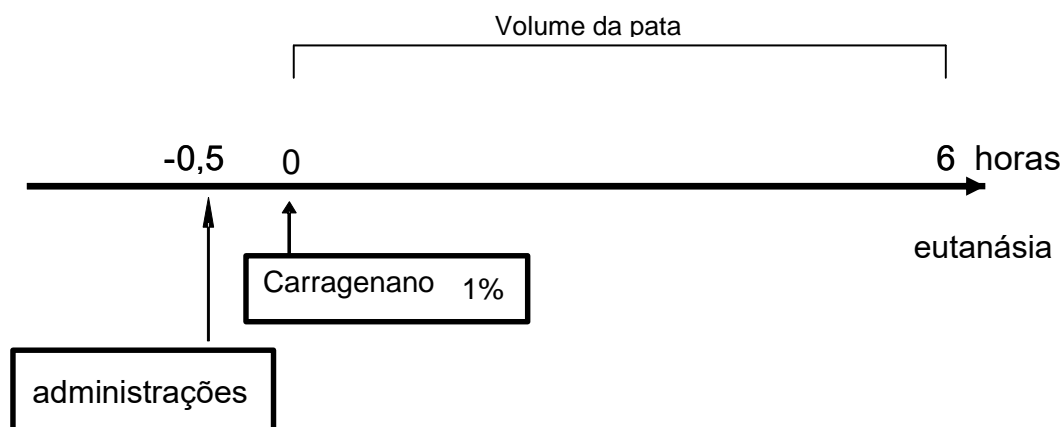


Figura III. 3. Esquema de tratamento do ensaio de avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação

3.2.5.2. Avaliação do edema

A avaliação do modelo foi feita por medição do volume da pata, medido por meio de um plestismómetro (Ugo Basile, Itália), imediatamente antes e 6 horas após a indução com carragenano.

O cálculo do edema foi feito pela diferença entre o volume inicial da pata direita (antes da indução) e o volume desta após 6 horas. Os resultados foram expressos como variação do volume da pata (mL). A ação anti-inflamatória das diferentes preparações testadas foi medida calculando a percentagem de inibição do desenvolvimento do edema, relativamente aos controlos.

3.2.6. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos e análises histológicas

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos e a análise histológica aos tecidos foram realizados pela empresa DNAtch (Lisboa).

3.2.6.1. Histologia

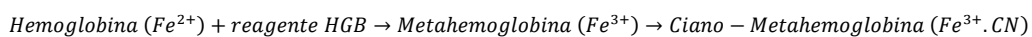
A análise histológica dos órgãos realizou-se de forma aleatória e apenas em 2 animais por grupo. Para os exames histopatológicos, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados (5 µm) em micrótomo, montados em lâminas de microscópio de vidro e corados com hematoxilina e eosina.

3.2.6.2. Hemograma

O hemograma das amostras de sangue foi realizado no sistema ADVIA® 120 Hematology System (Siemens).

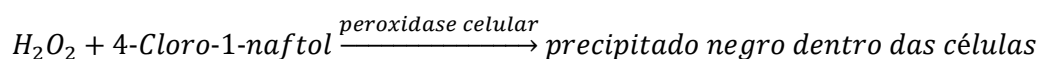
Para quantificar a hemoglobina presente nas amostras, utilizou-se um reagente que contém cianeto de potássio (20 mmol/L) e óxido de dimetillaurilamina a 2% (reagente HGB). Assim, na fase inicial da reação, os eritrócitos são lisados e libertam a hemoglobina (Hb). Seguidamente, o ferro do grupo heme da hemoglobina é oxidado, passando do estado ferroso (Fe^{2+}) ao estado férrico (Fe^{3+}). O Fe^{3+} combina-se, posteriormente, com o cianeto do reagente utilizado, formando o produto da reação cuja transmitância é lida a 546 nm (Equação 1).

Equação 1



A contagem leucocitária, ou seja a percentagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos presentes nas amostras foi obtida recorrendo ao uso de 3 reagentes específicos para o sistema ADVIA 120, nomeadamente ADVIA 120 PEROX 1 (dodecil sulfato de sódio a 0,36 mmol/L, sorbitol a 620 mmol/L, NaCl a 8,35 mmol/L, formaldeído a 5,5%, BRIJ- 35 a 0,1 mmol/L), ADVIA 120 PEROX 2 (4-Cloro-1-naftol a 44,8 mmol/L e dietilenoglicol a 99,2%) e ADVIA 120 PEROX 3 (H₂O₂ a 0,3 % e estabilizador). Deste modo, inicialmente ocorre a lise dos eritrócitos provocada por *stress* térmico combinado com o uso de tensoativos (dodecil sulfato de sódio e BRIJ-35). Ocorre fixação dos leucócitos pelo formaldeído e o meio hipertónico causa algum encolhimento e plasmólise dos mesmos, aumentando o índice de refração das células e melhorando a deteção dos linfócitos através do ruído. O 4-Cloro-1-naftol do reagente ADVIA 120 PEROX 2 serve como substrato que permite ao H₂O₂ do ADVIA 120 PEROX 3 formar um precipitado negro no interior dos grânulos dos leucócitos, com atividade peroxidásica como descrito na equação 2.

Equação 2



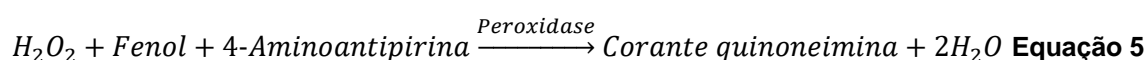
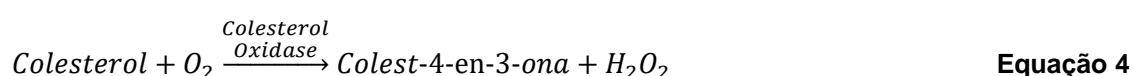
Neste ensaio, as células absorvem luz proporcionalmente à sua atividade de peroxidase e a dispersão de luz é proporcional ao volume celular. Assim, os dados de dispersão de luz e de absorvência permitem identificar populações de células distintas. A análise destas populações tem ainda como base a sua área, densidade e posição sendo que o número de células em cada população é depois processado.

3.2.6.3. Colesterol Total

Para avaliar o efeito da administração do farelo nos níveis do estado estacionário de esterol, o colesterol foi quantificado.

A determinação quantitativa do colesterol (COL) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0-675 mg/dl (0-17,48 mmol/l).

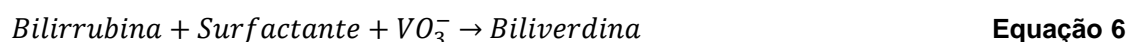
O método colesterol baseia-se num método enzimático que utiliza a conversão de colesterol esterase e colesterol oxidase, seguida de um ponto final do tipo Trinder. Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase em colesterol e em ácidos gordos livres (Equação 3). O colesterol é convertido em colesterol-3-ona pela colesterol oxidase na presença de oxigénio, formando peróxido de hidrogénio (Equação 4). Um complexo corado é formado a partir do peróxido de hidrogénio, da 4-aminoantipirina e do fenol sob a influência catalítica da peroxidase (Equação 5). A absorvência do complexo é lida como uma reação de ponto final a 505/694 nm.



3.2.6.4. Bilirrubina Total

A determinação quantitativa da atividade da bilirrubina total presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare).

O método baseia-se num método de oxidação química que utiliza o vanadato como agente de oxidação. A bilirrubina é oxidada por vanadato com aproximadamente pH 2,9 produzindo biliverdina. Na presença do detergente e do vanadato, tanto a bilirrubina conjugada (direta), como a bilirrubina não conjugada são oxidadas. Esta reação de oxidação provoca a diminuição da densidade ótica a 451/545 nm é proporcional à concentração de bilirrubina total na amostra. A concentração é medida como uma reação de ponto final.



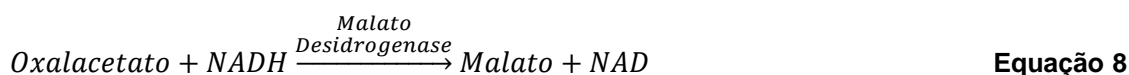
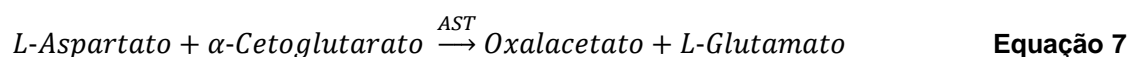
3.2.6.5. Aspartato aminotransferase (AST)

A determinação quantitativa da atividade do aspartato aminotransferase (AST) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0-1000 U/l, sendo que uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de NAD⁺ por minuto, a pH 7,6 e 37°C.

O método do AST baseia-se no trabalho de Karmen (Karmen *et al.*, 1955). Este procedimento foi posteriormente modificado por H.U.Bergmeyer (Bergmeyer *et al.*, 1978). Os reagentes da AST são formulados de acordo com as recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC).

O ensaio de doseamento da atividade do AST baseia-se na medição do oxaloacetato formado através do uso de uma reação acoplada dependente do NADH. Assim, pode seguir-se a formação do oxaloacetato através da oxidação do NADH pelo oxaloacetato catalisada pela malato desidrogenase (Equação 7). A oxidação do NADH é medida pelo decréscimo de absorvência a 340/ 410 nm. A reação é iniciada pela adição de α -cetoglutarato como segundo reagente (Equação 8).

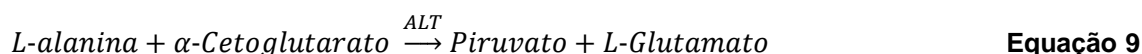
Equações das reações:

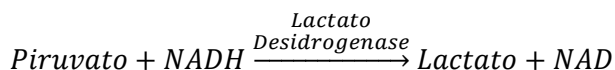


3.2.6.6. Alanina aminotransferase (ALT)

A determinação quantitativa da atividade da alanina aminotransferase (ALT) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0- 1100 U/l, sendo que uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de NAD^+ por minuto, a pH 7,6 e 37°C. O método da ALT baseia-se no trabalho de Wroblewski e LaDue (Wroblewski & LaDue, 1956). O procedimento foi posteriormente modificado por H.U.Bergmeyer (Bergmeyer *et al.*, 1978). O método usa uma reação enzimática acoplada, dependente do NADH, para a medição do piruvato formado pela ALT. Usa-se para este efeito NADH e lactato desidrogenase (Equação 10). No ensaio de doseamento da ALT a reação é iniciada pela adição de α -cetoglutarato como segundo reagente (Equação 9). A concentração de NADH (Equação 10) é medida pela sua absorvência a 340/410 nm e a diminuição da taxa de absorvência é proporcional à atividade da alanina aminotransferase.

Equações das reações:



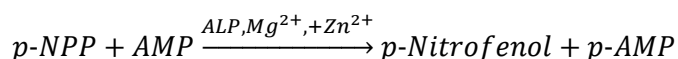


Equação 10

3.2.6.7. Fosfatase alcalina (ALP)

A determinação quantitativa da atividade da fosfatase alcalina (ALP) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0- 1100 U/l, sendo que uma unidade (U) é a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, a pH 10,3-10,4.

O método do doseamento de ALP baseia-se no trabalho de Tietz (Tietz, 1980). O ALP hidrolisa o substrato pNPP formando p-nitrofenol (Equação 11). A reação é seguida pela medição espectrofotométrica da velocidade de formação do p-nitrofenol a 410/ 478 nm. É utilizado um tampão de 2-amino-2-metil-1 propanol (AMP) para manter o pH da reação a 10,3-10,4. Adicionam-se iões de magnésio e zinco ao tampão AMP para ativar e estabilizar a enzima.



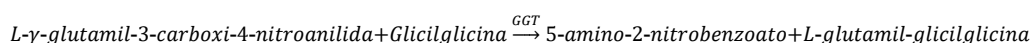
Equação 11

3.2.6.8. Gama-glutamil transferase (GGT)

A determinação quantitativa da atividade do gama-glutamil transferase (GGT) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0-1200 U/l, sendo que uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de 5-amino-2-nitro-benzoato por minuto, a pH 8,25 e 30°C.

O método ADVIA para o doseamento de GGT baseia-se no procedimento descrito por L.M. Shaw (Shaw *et al.*, 1977). No ensaio de doseamento do GGT, é usado um substrato sintético (L-γ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida), em que a glicilglicina atua como recetor do resíduo de γ-glutamil, sendo libertado 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB) (Equação 12). O produto libertado tem uma absorção máxima próximo de 400 nm. A taxa de formação é medida por teste fotométrico a 410/478 nm como uma reação com cinética de ordem zero.

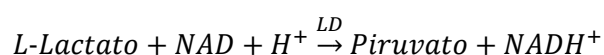
Equação 12



3.2.6.9. Lactato Desidrogenase (LDH)

A determinação quantitativa da atividade do lactato desidrogenase (LDH) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 20-700 U/l. O método ADVIA do LDH baseia-se no procedimento desenvolvido por Amador, Dorfman e Wacker (Amador et al., 1965). O método foi automatizado por Morgernstern, Flor, Kessler e Klein (Morgernstern et al., 1965) e modificado por Morgernstern, Rush e Lehman (Morgernstern et al., 1973).

O método baseia-se na recomendação de Richards, Lubinski e Vanderlinde para a utilização do tampão TRIS em vez de tampão AMP (Richard et. al., 1975). A LD cataliza a conversão do L-lactato em piruvato na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Equação 13). A atividade enzimática da LD é proporcional à velocidade de produção de NADH (NAD reduzida). A quantidade de NADH produzida é determinada pela medição do aumento de absorvência a 340/410nm.



Equação 13

3.2.7. Análise Estatística

A análise estatística teve por base os seguintes testes, o Teste-F de igualdade de variâncias, e o teste ANOVA Fator Único. A probabilidade aceitável para uma diferença significativa entre os valores médios foi de $p < 0,05$.

IV. Resultados e Discussão

O farelo de arroz possui um elevado valor nutricional e apresenta benefícios promissores para a saúde (Jariwalla, 2001). Neste sentido, diversos estudos mostraram que os compostos bioativos presentes no farelo de arroz como o orizanol, vitamina E, polifenóis e fitoesteróis por apresentarem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Islam et al., 2011), reduzem danos oxidativos em estruturas biomoleculares, estruturas essas que têm um papel importante na prevenção de diversas doenças crônicas (Rohrer & Siebenmorgen, 2004). Nomeadamente, estudos feitos em animais e humanos aos quais foi administrado farelo de arroz demonstraram, por exemplo, uma redução dos níveis de colesterol sanguíneo (Kahlon et al., 1996), o controlo metabólico de doenças cardiovasculares (Cicero e Derosa, 2005) e atividade anticancerígena (Henderson et al., 2012).

Com o propósito de avaliar o potencial de farelo de arroz para a alimentação humana, realizou-se um estudo dividido em quatro ensaios. O primeiro ensaio, dividido em duas partes, A e B, teve como objetivo estudar possíveis sinais de toxicidade através da administração de doses única e múltipla de farelo de arroz. O segundo ensaio, permitiu avaliar o efeito da administração de farelo de arroz nos níveis de colesterol sanguíneo em animais com uma alimentação normal. O terceiro ensaio, possibilitou avaliar o efeito protetor do farelo de arroz, nomeadamente, na proteção hepática e de estômago relativamente ao *stress* induzido pela administração continuada de etanol. O último ensaio, ensaio 4, permitiu analisar a possível atividade anti-inflamatória do farelo de arroz num modelo de inflamação induzida pelo carragenano, através da medição do aumento de volume da pata induzida dos animais em estudo.

Ensaio 1.A - Avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade (dose única)

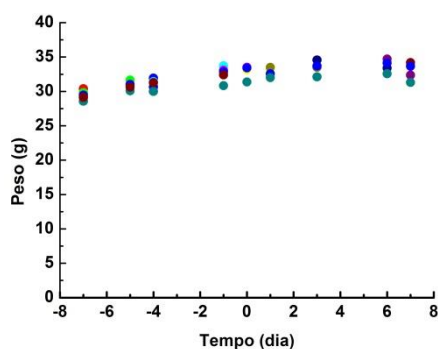
Este ensaio permitiu estudar possíveis sinais iniciais de toxicidade e determinar com exatidão os efeitos adversos, ou não, resultantes da exposição de farelo de arroz estabilizado e desengordurado nos animais envolvidos. Este tipo de ensaio é de extrema importância pois contribui para a identificação de potenciais efeitos adversos após a ingestão da(s) substância(s) a analisar e, vai permitir a comprovação ou não da segurança alimentar, tendo sempre em mente a dose testada. Estes ensaios irão permitir igualmente identificar mecanismos de toxicidade e seguidamente permitir extrapolar os efeitos observados nos modelos animais para o homem.

Neste ensaio de identificação de sinais de toxicidade foi feita uma única administração (Dia 0). No entanto, os animais foram monitorizados em relação ao seu comportamento e características a partir de 7 dias antes da administração (Dia -7). Nos sete dias seguintes à administração, ou seja até ao Dia 7, os animais continuaram a ser monitorizados diariamente para identificação de possíveis sinais de toxicidade, bem como qualquer modificação de comportamento. Durante o período do ensaio, não foram observadas modificações de comportamento dos animais pertencentes aos vários grupos, aos quais foram administrados suspensões de farelo de arroz quando comparadas com o comportamento dos animais do grupo controlo, ou seja, não foram observáveis efeitos comportamentais nos animais após uma única administração dos farelos, nas duas doses em estudo que evidenciem sinais visíveis de toxicidade.

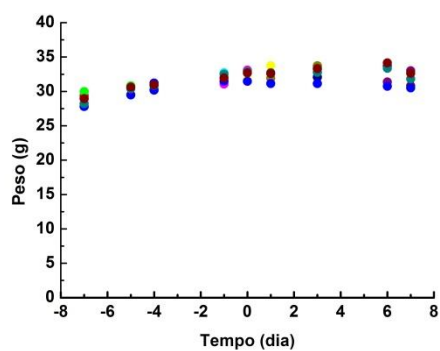
Os parâmetros monitorizados nos animais foram: evolução do peso de cada animal, o consumo de água e ração por cada grupo em estudo.

A evolução do peso dos animais ao longo do tempo está representada na Figura IV. 1.A.1.

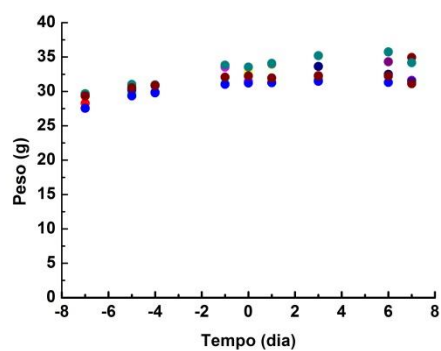
Grupo I - Controlo



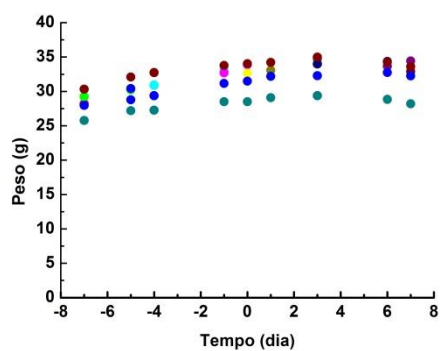
Grupo II – Amostra 1 dose 1



Grupo III – Amostra 1 dose 2



Grupo IV – Amostra 2 dose 1



Grupo V – Amostra 2 dose 2

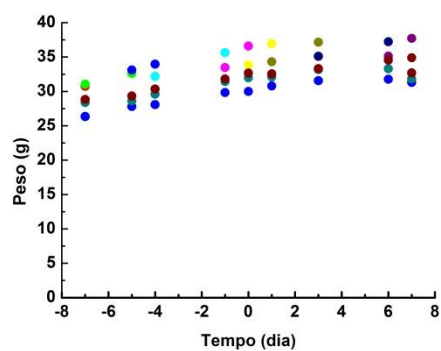


Figura IV.1.A. 1. Peso de cada animal dos vários grupos em estudo durante o tempo do ensaio 1.A. Cada cor corresponde a um animal do estudo (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg

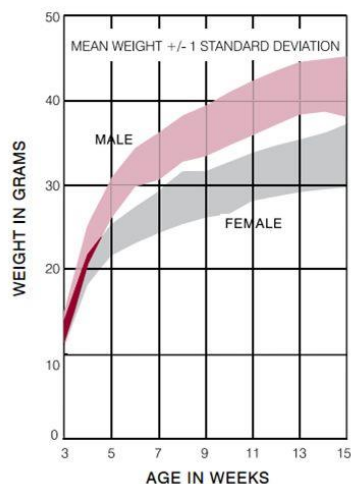


Figura IV.1.A. 2. Curva de crescimento da estirpe CD1 do fornecedor Charles River Laboratories.

Nos cinco grupos em análise observou-se um crescimento idêntico dos animais e independente do grupo em estudo. A evolução do peso observada encontra-se dentro dos parâmetros descritos desta mesma espécie/estirpe, de acordo com o fornecedor *Charles River Laboratories* (Figura IV.A.2.).

As Figuras IV.1.A.3. e IV.1.A.4. representam os consumos médios por animal de água e ração nos diferentes grupos.

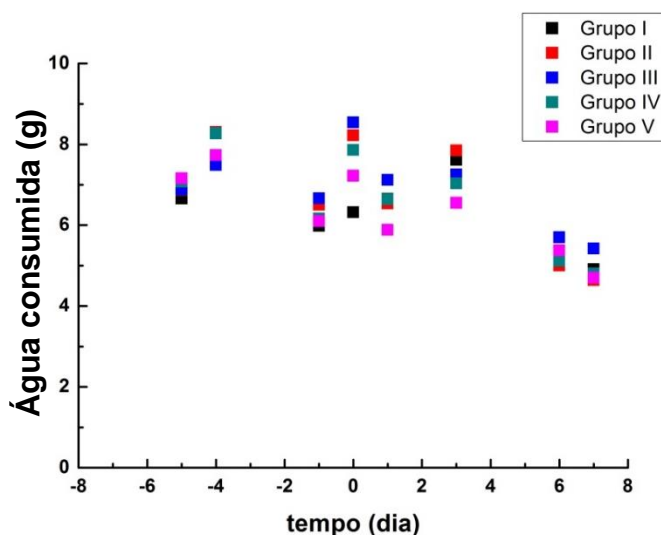


Figura IV.1.A. 3. Quantidade média de água consumida por animal, para cada grupo em estudo, ao longo do tempo para o ensaio 1.A (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg

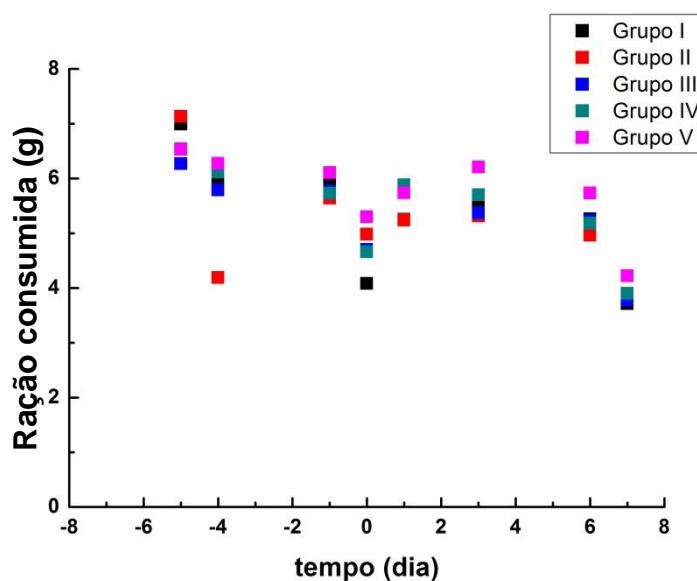


Figura IV.1.A. 4. Quantidade média de ração consumida por animal, para cada grupo em estudo, ao longo do tempo para o ensaio 1.A (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg

Pela análise da Figura IV.1.A.3., para todos os grupos de animais administrados com os dois tipos de farelo e as duas doses estudadas (500 e 250 mg/kg de animal), não se verificam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na variação dos pesos dos animais, bem como, no consumo de água e de ração, quando comparado com o grupo de controlo (Grupo I - administração de água).

As fezes dos animais foram coletadas da cama das gaiolas, e os valores dos pesos médios das fezes por animal e por dia, para os diferentes grupos estão registados na Tabela IV.1.A.1.

Tabela IV.1.A. 1. Evolução do peso médio das fezes coletadas por animal, por dia, após a administração para cada grupo experimental (Dia 0 – dia da administração). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Valor médio do peso das fezes coletadas por animal por dia	Dia 0 a Dia 1 (g)	Dia 1 a Dia 3 (g)	Dia 3 a Dia 7 (g)
Grupo I	1,28	1,50	1,45
Grupo II	1,34	1,45	1,31
Grupo III	1,55	1,61	1,42
Grupo IV	1,57	1,69	1,43
Grupo V	1,44	1,66	1,53

Após a administração dos diferentes tipos e doses de suspensão de farelo de arroz, observou-se que o peso médio das fezes não apresentaram alterações estatísticas relevantes relativamente ao grupo controlo (Grupo I). Deste modo, uma única administração de farelo de arroz não permite tirar conclusões significativas relativamente ao potencial efeito deste na produção de fezes.

Para a identificação de potenciais alterações de parâmetros bioquímicos e hematológicos nas amostras de sangue recolhidas, foram determinados os seguintes parâmetros:

- em sangue total: o hemograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume globular médio, hemoglobina globular média, concentração de hemoglobina globular média, variação de tamanho das hemácias, leucócitos) a fórmula leucocitária (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos) as plaquetas (volume plaquetário médio, plaquetócrito, amplitude de distribuição de plaquetas) e;

- em plasma: bilirrubina total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase (gama-GT)).

Para qualquer dos parâmetros em estudo não foram assinaladas alterações dos mesmos, comparando quer com os valores de referência para a espécie/estirpe quer relativamente aos valores obtidos para o grupo controlo (Grupo I).

Após a necrópsia, os órgãos de interesse (fígado, baço, coração e rim) foram recolhidos, analisados macroscopicamente e pesados. Os pesos médios de cada órgão foram normalizados ao peso corporal de cada animal. Os valores obtidos encontram-se apresentados na Figura IV.1.A.5. Esta normalização vai permitir detetar desvios relativamente ao peso de cada órgão, o que poderá evidenciar sinais de toxicidade eliminando as diferenças relativamente ao peso de cada animal.

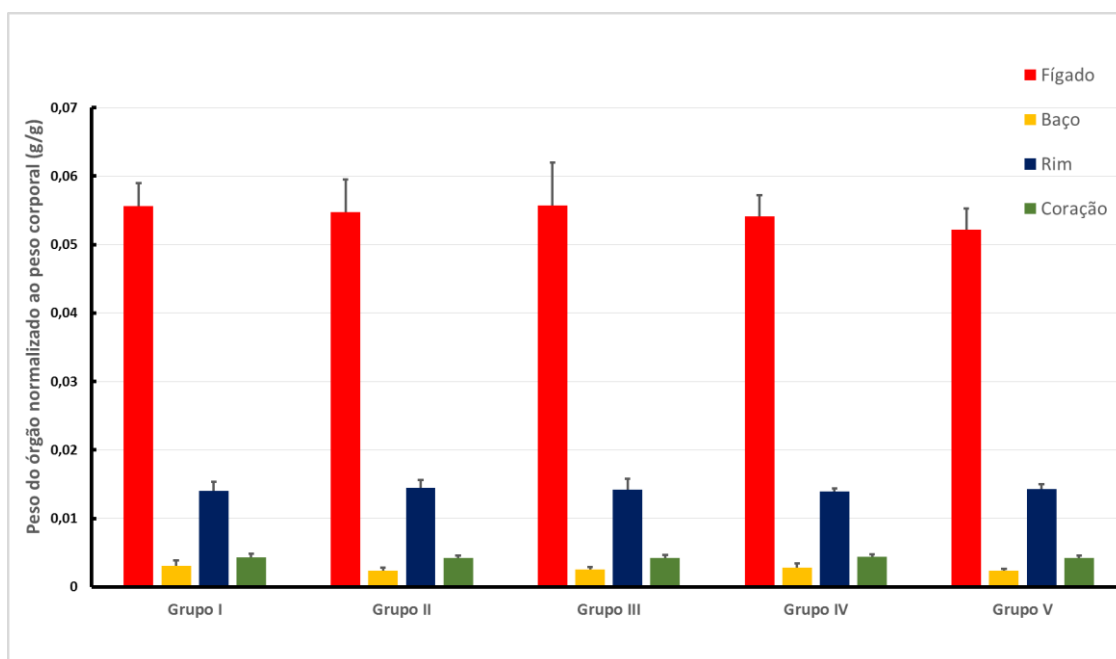


Figura IV.1.A. 5. Peso dos órgãos normalizado ao peso corporal de cada animal para os diferentes grupos. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Para uma melhor visualização de alterações do peso individualizado de cada órgão (fígado, baço, rins e coração), por cada animal normalizado ao seu respetivo peso, representaram-se os valores individuais para cada grupo de estudo (Figura IV.1.A.6.).

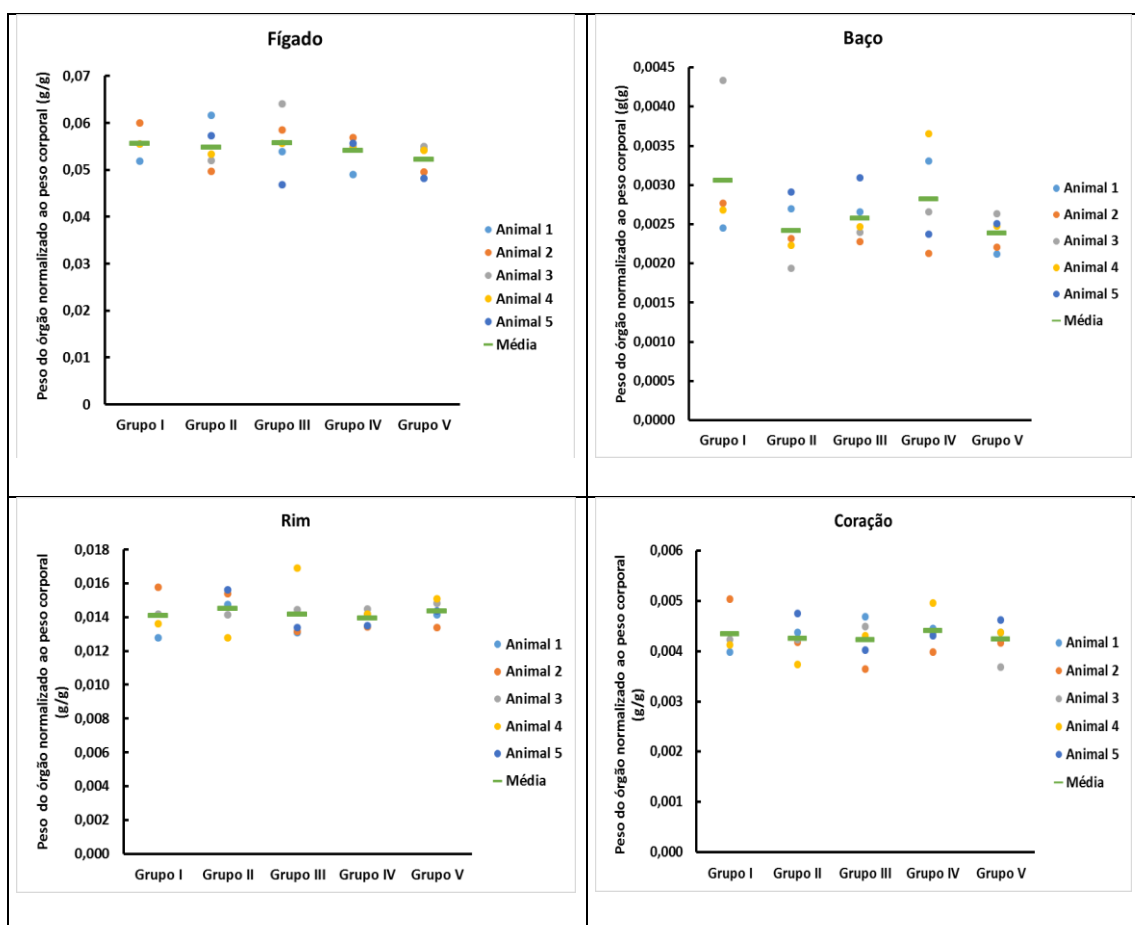


Figura IV.1.A. 6. Peso de cada órgão (fígado, baço, rim e coração) dos animais dos vários grupos do ensaio 1.A normalizado ao peso corporal. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Pela análise da Figura IV.A.7, pode observar-se que, no Grupo I, o animal 3 apresentou um peso relativo do baço muito acima dos restantes. Contudo o Grupo I, por se tratar do grupo de controlo, tendo sido apenas administrado água ao longo do ensaio, não se pode relacionar este efeito com o farelo de arroz administrado, assumindo-se como uma variação biológica própria do animal. Ainda no Grupo I, é visível para o animal 2 um peso relativo do coração um pouco mais elevado que os restantes, sem ser, no entanto, um resultado conclusivo. É possível observar no Grupo III, um animal que apresenta um valor de peso relativo do rim um pouco acima dos restantes, mas sem significativo estatístico. Deste modo, não foram observadas diferenças com significado estatístico quando se comparam os pesos normalizados com os obtidos para os animais do grupo controlo (Grupo I).

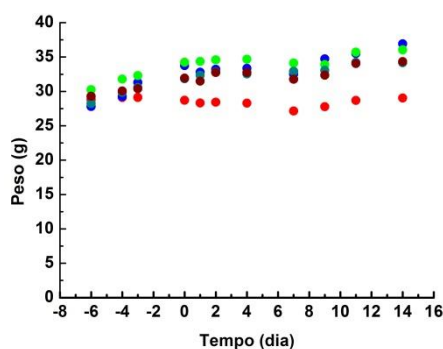
Com base nos resultados obtidos, pode concluir-se que a administração de uma única dose de farelo, tanto de farelo desengordurado como de farelo estabilizado, quer para a dose de 250 mg/kg (dose 1) ou para a dose de 500 mg/kg (dose 2), não está associada a sinais de toxicidade macroscópicos nem microscópicos.

Ensaio 1.B - Avaliação de possíveis sinais iniciais de toxicidade (dose múltipla)

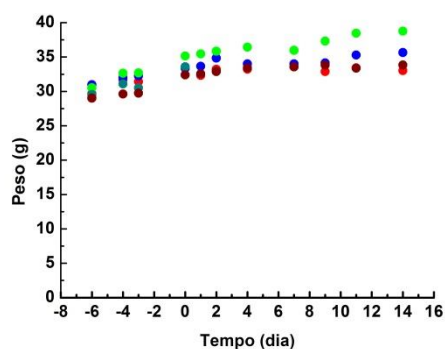
Outro ensaio realizado neste estudo consistiu na administração de 6 doses de suspensão de dois farelos (duas doses) ao longo de 2 semanas. À semelhança do ensaio A, os animais foram monitorizados em relação ao seu comportamento e características durante 7 dias antes da primeira administração. Após a primeira administração (Dia 0) e até ao final do ensaio (Dia 14), os animais foram observados e avaliados diariamente para identificação de possíveis sinais de toxicidade bem como qualquer modificação de comportamento.

Tal como observado para o ensaio 1-A, neste ensaio também não foram observadas modificações ou alterações do comportamento dos animais dos vários grupos aos quais foram administradas as suspensões de farelo de arroz comparativamente ao comportamento dos animais do grupo controlo.

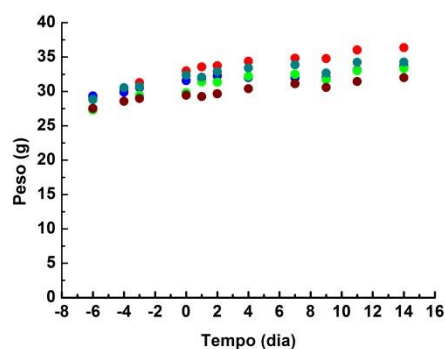
Grupo I - Controlo



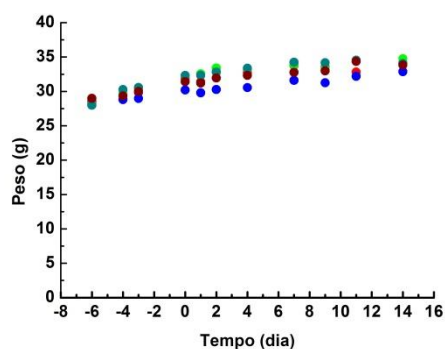
Grupo II – Amostra 1 dose 1



Grupo III – Amostra 1 dose 2



Grupo IV – Amostra 2 dose 1



Grupo V – Amostra 2 dose 2

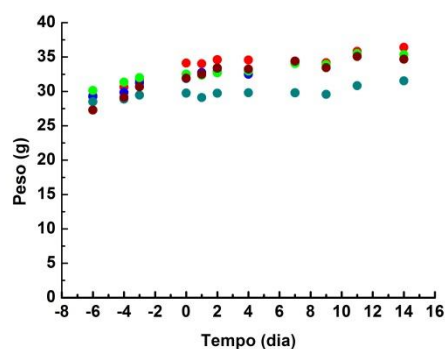


Figura IV.1.B. 1. Peso de cada animal dos vários grupos em estudo durante o tempo do ensaio 1.B. Cada cor corresponde a um animal do estudo (n=5). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Na Figura IV.1.B.1. estão apresentados os valores medidos para o peso de cada animal (por grupo) ao longo do tempo do ensaio. Analisando os resultados obtidos não se observam alterações significativas do peso dos animais dos grupos que receberam farelo de arroz relativamente ao grupo controlo. Pode-se ainda afirmar que a evolução do peso dos animais ao longo do tempo encontra-se dentro dos parâmetros descritos para os animais desta espécie/estirpe, de acordo com o fornecedor *Charles River Laboratories*.

O consumo médio de água e ração por animal e por grupo em estudo foi avaliado e os resultados obtidos encontram-se representado, respetivamente, nas Figuras IV.1.B.2. e IV.1.B.3.

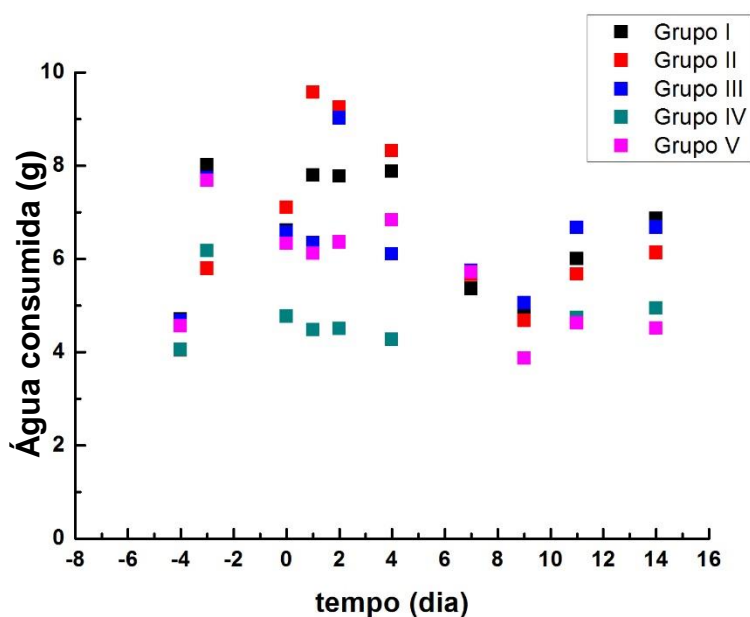


Figura IV.1.B. 2. Quantidade média de água consumida por animal para cada grupo, ao longo do tempo no ensaio 1.B. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

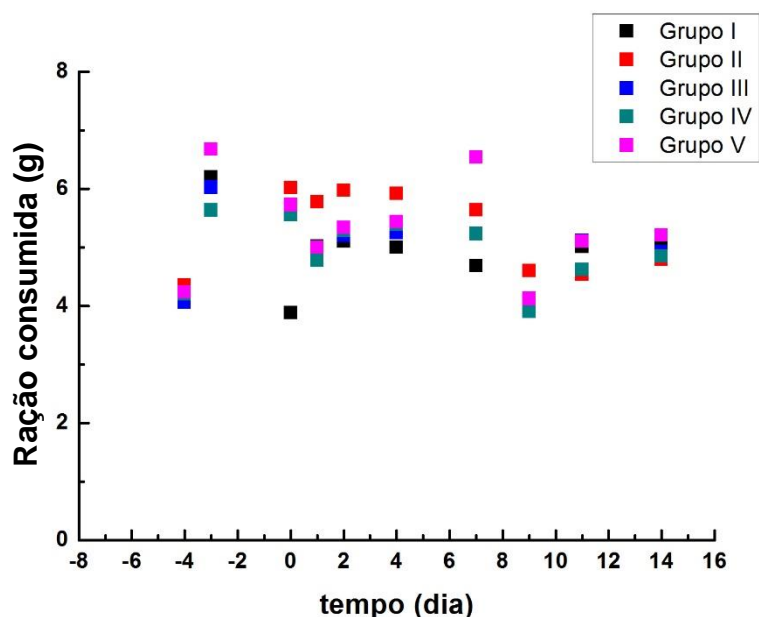


Figura IV.1.B. 3. Quantidade média de ração consumida por animal para cada grupo, ao longo do tempo no ensaio 1.B. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Pela análise da Figura IV.1.B.2., poderemos inferir que o Grupo IV (Farelo Estabilizado à dose de 500 mg/kg) foi o grupo que apresentou, em termos médios, um menor consumo de água ao longo do ensaio. No entanto, dado que este baixo nível de consumo de água já era observável antes do Dia 0, tal não pode ser atribuível à administração de Farelo estabilizado. É de notar que pequenas alterações no consumo de água não está diretamente associadas quer ao tipo de farelo usado, quer às diferenças nas doses administradas, comparativamente com o consumo do grupo controlo (Grupo I).

Quanto ao consumo de ração, Figura IV.1.B.3., é de salientar que se observou um comportamento idêntico ao do consumo de água, não sendo possível atribuir pequenas alterações às administrações das suspensões de farelo.

Ao longo do ensaio, as fezes dos animais foram coletadas da cama das gaiolas para os diferentes grupos e os valores dos pesos médios das fezes estão apresentados na Tabela IV.1.B.1.

Tabela IV.1.B. 1. Evolução do peso médio das fezes coletadas por animal, por dia, após a administração para cada grupo experimental (Dia 0 – dia da administração). Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Valor médio do peso das fezes coletadas por animal por dia	Dia 0 a Dia 1 (g)	Dia 1 a Dia 2 (g)	Dia 1 a Dia 4 (g)	Dia 4 a Dia 7 (g)	Dia 7 a Dia 9 (g)	Dia 9 a Dia 11 (g)	Dia 11 a Dia 14 (g)
Grupo I	1,54	1,62	1,36	1,30	1,12	1,37	1,42
Grupo II	1,84	1,91	1,76	1,67	1,30	1,23	1,32
Grupo III	1,36	1,61	1,40	1,39	1,14	1,39	1,37
Grupo IV	1,51	1,53	1,49	1,47	1,09	1,28	1,40
Grupo V	1,40	1,50	1,48	1,75	1,18	1,34	1,43

Após a primeira administração, nos animais do Grupo II é notória uma subida do peso médio das fezes que se destaca dos restantes grupos, contudo nos dois últimos dias registou os valores mais baixos. Pela análise dos valores, pode-se concluir que não ocorreram alterações muito relevantes relativamente ao grupo controlo (Grupo I).

Tal como para o ensaio 1-A, a partir das amostras de sangue recolhidas no final do mesmo foram quantificados e/ou determinados os seguintes parâmetros em sangue total: o hemograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume globular médio, hemoglobina globular média, concentração de hemoglobina globular média, variação de tamanho das hemácias, leucócitos) a fórmula leucocitária (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos) as plaquetas (volume plaquetário médio, plaquetócrito, amplitude de distribuição de plaquetas) e os seguintes parâmetros bioquímicos em plasma (bilirrubina total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase (gama-GT)). Em nenhum destes parâmetros foram assinaladas alterações dos valores relativamente aos valores do grupo controlo (Grupo I) e aos valores de referência para esta estirpe/espécie em estudo.

Após a necrópsia, os órgãos de interesse (fígado, baço, rim e coração) foram recolhidos e os respetivos pesos registados e os valores médios normalizados para cada grupo, por órgão, encontram-se apresentados na Figura IV.1.B.4.

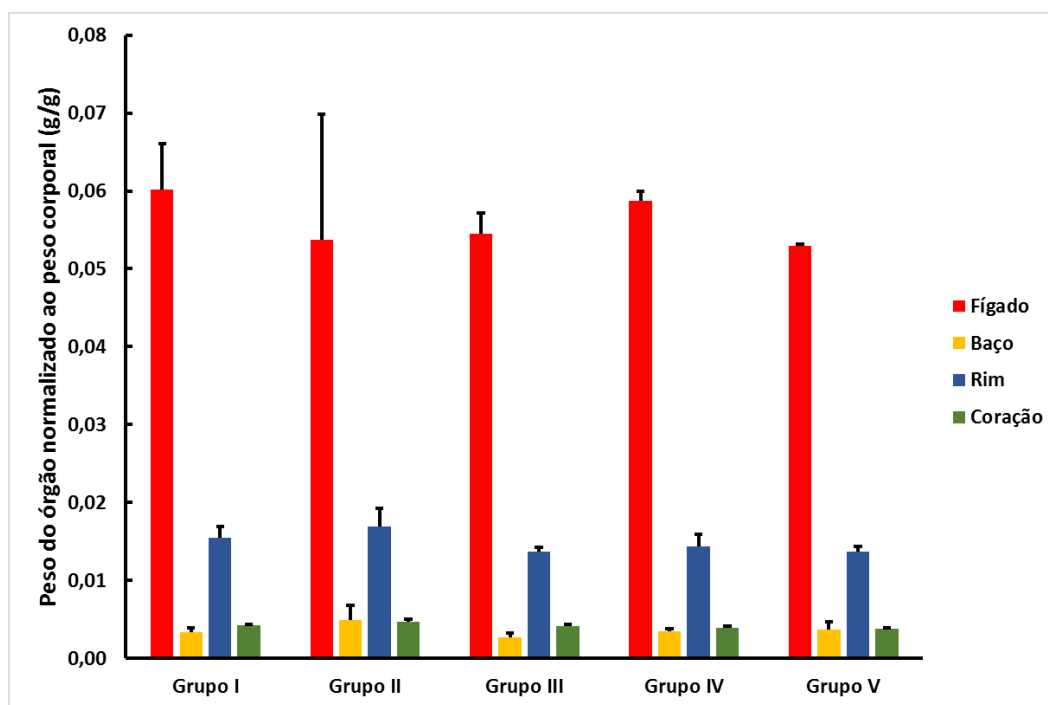


Figura IV.1.B. 4. Peso dos órgãos normalizado ao peso corporal de cada animal para os diferentes grupos. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Como referido, os valores apresentados na Figura IV.1.B.4. foram obtidos por normalização do peso de cada órgão ao peso corporal de cada animal. Esta normalização vai permitir detetar desvios relativamente ao peso de cada órgão, o que poderá evidenciar sinais de toxicidade. Pela análise da Figura IV.1.B.4., é possível observar que o peso do fígado dos animais do grupo II apresentam valores mais heterógenos, sendo visível um desvio padrão bastante maior quando comparado com os restantes grupos. Deste modo, para uma melhor visualização de alterações do peso individualizado de cada órgão (fígado, baço, rins e coração) por cada animal, normalizado ao seu respetivo peso corporal representaram-se os valores individuais para cada grupo (Figura IV.1.B.5.).

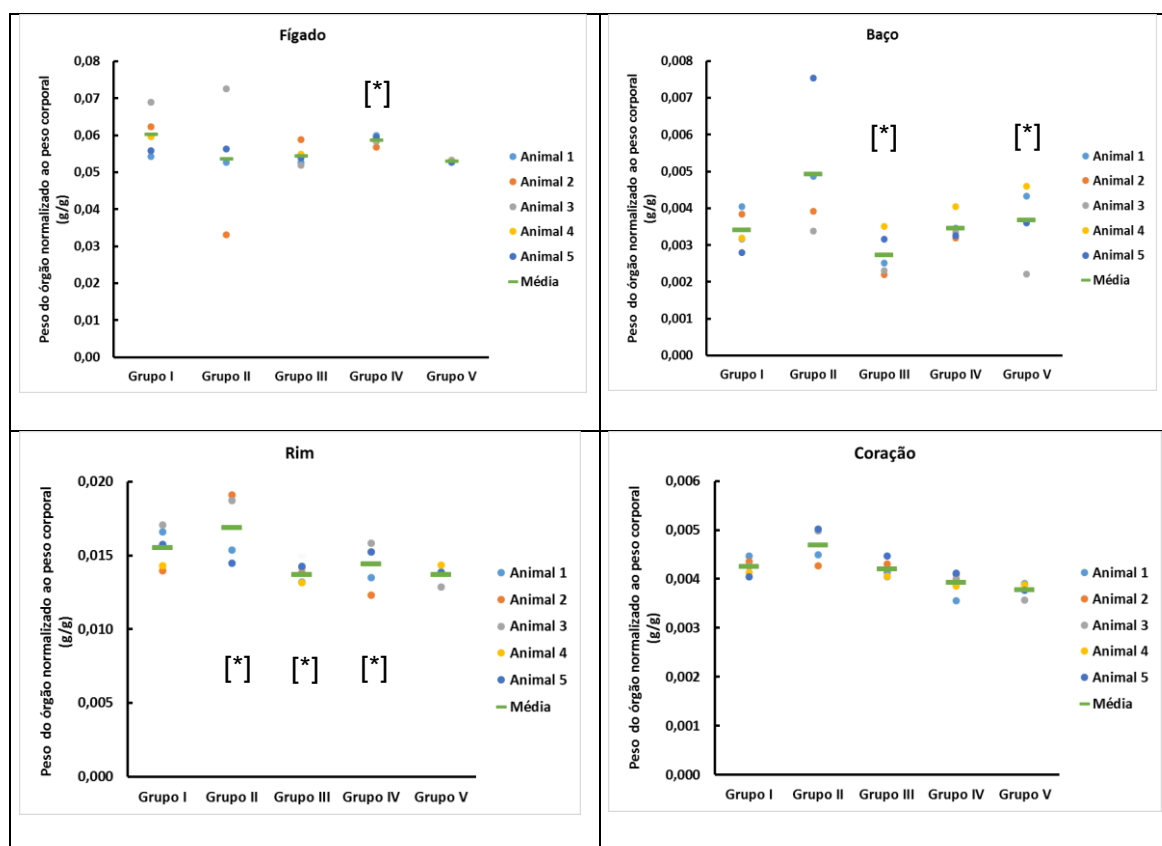


Figura IV.1.B. 5. Peso de cada órgão (fígado, baço, rim e coração) dos animais dos vários grupos do Ensaio 1.B normalizado ao peso corporal. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). [*] $p < 0.05$ versus Grupo I (Teste F).

Com a análise da Figura IV.1.B.5., ao contrário do estudo A, no que diz respeito ao peso dos órgãos dos animais que receberam 6 administrações de farelo já são visíveis alterações com significado estatístico ($p < 0,05$), relativamente ao grupo de controlo nos seguintes casos: no fígado apenas para o Grupo IV (Farelo Estabilizado na dose maior); no baço para os Grupos III (Farelo Desengordurado na dose mais baixa) e V (Farelo Estabilizado na dose mais baixa); e no rim para os Grupos II (Farelo Desengordurado na dose maior), III (Farelo Desengordurado na dose mais baixa) e IV (Farelo Estabilizado na dose maior). No entanto, com exceção do fígado, o Grupo II referente ao Farelo Desengordurado na dose maior apresenta para todos os outros órgãos em estudo, um valor médio de peso de órgão mais elevado que o grupo controlo e que os outros grupos de animais que receberam farelo de arroz. Neste sentido, pode indicar sinais de toxicidade por parte do farelo desengordurado.

De entre os diferentes grupos, selecionaram-se alguns animais e os respetivos órgãos foram sujeitos a estudos de histopatologia. Os resultados indicaram que, na análise histopatológica realizada ao fígado, apenas um animal do Grupo IV apresentava

um ligeiro infiltrado inflamatório (Figura IV.1.B.6. - B), quando comparada com a análise do fígado de animais do grupo controlo (Grupo I) que não revelou alterações (Figura IV.1.B.6. - A).

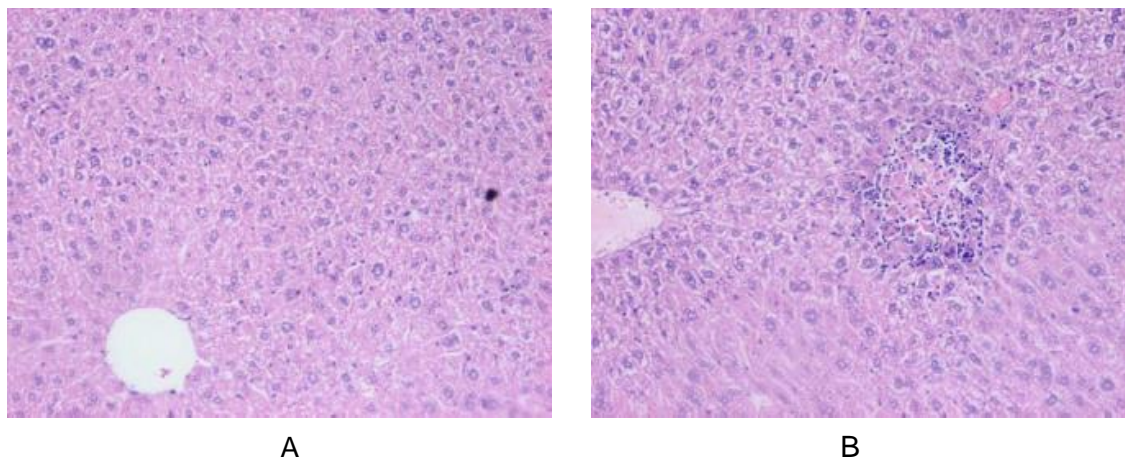


Figura IV.1.B. 6. A. Microfotografia do fígado de um animal do Grupo I (controlo); B. Microfotografia do fígado de um animal do Grupo IV ilustrando um infiltrado inflamatório; (ampliações, 100x).

Ensaio 2 - Avaliação do efeito dos níveis colesterol plasmático (dose única e dose múltipla)

O colesterol é uma importante substância no organismo que se encontra envolvida em diferentes funções e mecanismos como, por exemplo, na síntese de membranas celulares, de vitamina D na superfície da pele, e de sais biliares (Daniel et al., 2009). São duas as fontes de colesterol no organismo humano: a alimentação (Gaw, 2008) e a síntese pelo organismo, principalmente, no fígado (Ranjan, 2009). A importância no controlo dos níveis de colesterol no sangue deriva da sua associação a doenças cardiovasculares sendo considerado a hipercolesterolemia, elevados níveis de colesterol sanguíneo, um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares.

Atendendo a isto torna-se essencial tentarmos procurar alternativas, a nível da alimentação, que permitam de certa forma, fornecer uma influência positiva na diminuição de colesterol plasmático nos seres humanos. Para tal, o estudo apresentado neste trabalho foi realizado com o intuito de avaliar se o farelo de arroz teria uma influência positiva nos níveis de colesterol plasmático quando associado a uma alimentação normal. Neste sentido, e à semelhança do ensaio anterior, através de uma

administração única e múltipla de farelo de arroz estabilizado e desengordurado, realizou-se a avaliação do efeito destes nos níveis de colesterol plasmático dos animais.

Na Figura IV.2.1. estão reunidos os valores de colesterol quantificados no plasma dos animais, nos diferentes grupos, para uma administração única (dose única) com o esquema de tratamento descrito para o ensaio 1-A.

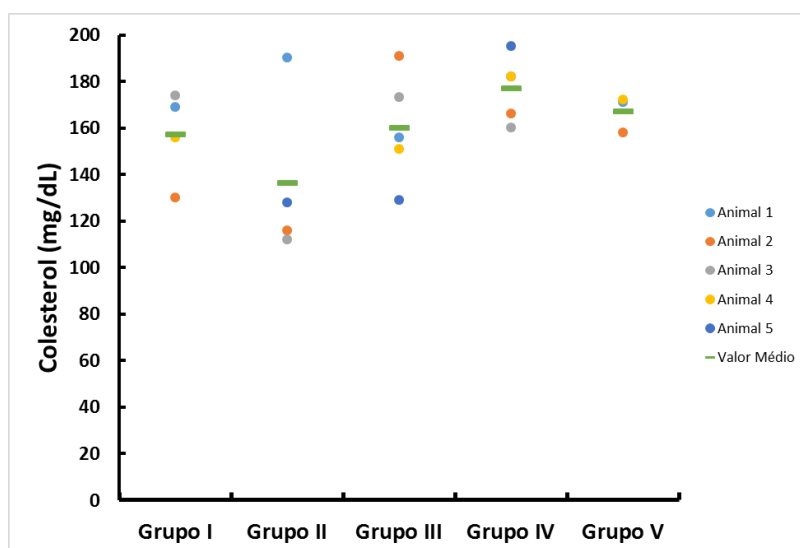


Figura IV.2. 1. Quantidade de colesterol total doseado no plasma dos animais dos vários grupos na dose única, 7 dias após a administração. Grupo I – Controle; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5).

Pela análise da figura, no Grupo II (farelo desengordurado), o animal 1 destaca-se por apresentar um valor de colesterol distante (elevado) dos restantes animais do grupo, contudo não apresenta um valor fora dos valores de referência de colesterol para esta estirpe/espécie. Os grupos II e III, ambos de farelo desengordurado, apresentam os valores médios tendencialmente mais baixos de colesterol, no entanto sem significado estatístico quando comparado com os observados para o grupo controle (Grupo I). Os Grupos IV e V apresentaram valores iguais ao do Grupo I (grupo controle). Deste modo, conclui-se, que a administração de uma única dose de farelo, tanto de Farelo Desengordurado como de Farelo Estabilizado, quer para a dose de 250 mg/kg (dose 1) ou para a dose de 500 mg/kg (dose 2), não se traduz em alterações significativas nos níveis de colesterol plasmático.

No que diz respeito, à administração múltipla de farelo de arroz (com um esquema idêntico ao do Ensaio 1-B), o colesterol foi igualmente determinado no plasma dos animais e os resultados estão apresentados na Figura IV.2.2.

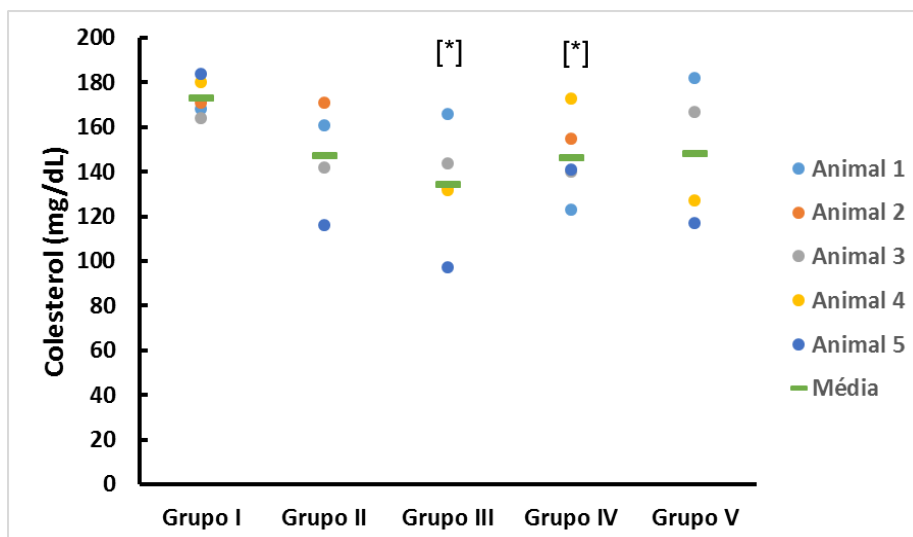


Figura IV.2. 2. Quantidade de colesterol total doseado no plasma dos animais dos vários grupos do ensaio B, 14 dias após a administração. Grupo I – Controlo; Grupo II – Farelo Desengordurado 500mg/kg; Grupo III – Farelo Desengordurado 250mg/kg; Grupo IV – Farelo Estabilizado 500mg/kg; Grupo V – Farelo Estabilizado 250 mg/kg (n=5). [*] $p < 0.05$ versus Grupo I (one-way ANOVA).

Ao contrário da dose única, neste estudo de dose múltipla as alterações observadas com significado estatístico ($p < 0,05$) por comparação com o Grupo I, dizem respeito aos animais dos Grupos III (Farelo Desengordurado na menor dose) e IV (Farelo Estabilizado na dose maior). Estes animais apresentam valores de colesterol mais baixos do que os observados para os animais do Grupo I (grupo controlo). Para todos os grupos que receberam 6 administrações de farelo, a média dos valores determinados para o colesterol plasmático é inferior ao valor médio para o grupo controlo (Grupo I), no entanto esta diminuição não tem significado estatístico. Poder-se-á concluir que a ingestão repetida de farelo de arroz poderá estar associada a modificações dos níveis de colesterol, mas que necessita de mais estudos conclusivos.

Na literatura, existem estudos que indicam que o farelo de arroz tem vindo a demonstrar redução dos níveis de colesterol plasmáticos tanto em animais como em humanos com hipercolesterolemia (Kahlon et al., 1990; Kahlon et al., 1991; Hegsted et al., 1993; Gerhardt e Gallo, 1998). Segundo um estudo realizado por Sanders et al. 1992, em humanos com níveis de colesterol normais, é sugerido que o consumo diário de 30g de farelo de arroz estabilizado não contribuiu para a redução dos níveis de

colesterol plasmáticos. Contudo outros autores (Gerhardt e Gallo, 1998) que realizaram um estudo em humanos com hipercolesterolemia com a duração de 6 semanas, em que foi administrado farelo de arroz estabilizado e farelo de aveia, observaram reduções dos níveis de colesterol com o consumo dos dois tipos de farelo, pelo que os autores sugerem que estes dois tipos de farelo devem ser inseridos na dieta de indivíduos com hipercolesterolemia.

Poderemos então resumir que, nos estudos apresentados na literatura em indivíduos que apresentem níveis de colesterol normal, a introdução de farelo de arroz na dieta em nada altera os valores de colesterol plasmático, já em indivíduos com hipercolesterolemia a sua introdução na dieta está associada a reduções dos níveis de colesterol plasmático.

Neste ensaio em animais, as alterações observadas não são conclusivas. Para elucidar o possível efeito da ingestão de farelo de arroz nos níveis de colesterol plasmático, o tempo de ensaio poderia ser aumentado, ou ainda, alterar a dieta para uma dieta rica em gordura em que se aumentasse os níveis de colesterol plasmático e estudar nestes casos o efeito da administração de farelo.

Ensaio 3 - Avaliação do efeito antioxidante no modelo animal de *stress* oxidativo induzido pelo etanol

No presente estudo foi analisada a capacidade de proteção de diferentes doses de farelo de arroz estabilizado e desengordurado, e os efeitos nocivos provocados administração de etanol. Este modelo tem por base o modelo animal de *stress* oxidativo descrito por Pari e Suresh (Pari & Suresh 2008) e Hsieh, Yeh, Lee e Huang (Hsieh et al. 2014).

Neste modelo, e com o intuito de se obterem respostas num período de tempo razoavelmente curto, o *stress* oxidativo nos animais é induzido através da administração de etanol em dias consecutivos. A ingestão continuada deste composto leva a um aumento do *stress* oxidativo pelo aumento na produção de ROS. Este modelo permite-nos avaliar o potencial efeito antioxidante do farelo de arroz essencialmente a nível hepático através da avaliação do comportamento de biomarcadores de *stress* oxidativo, como AST, ALT, ALP e Gama-GT. Se a atividade destas enzimas AST, ALT, ALP e Gama-GT apresentar níveis elevados, indica-nos permeabilidade e danos nos tecidos ou a necrose de hepatócitos (Hsieh et al., 2014).

Durante a duração do modelo, os animais foram monitorizados para a identificação de sinais de morbilidade e mortalidade. De facto, observou-se a morte de alguns animais. A distribuição temporal e grupo de tratamento a que pertenciam os animais que morreram está representada na Tabela IV.3.1.

Tabela IV.3. 1. Distribuição temporal e por grupo de tratamento do número de animais que morreram no decurso do Ensaio 3. Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol); Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol.

Semana	1	2	3	4
Grupo				
I	0	0	0	0
II	0	0	0	0
III	0	0	0	0
IV	0	0	1	0
V	0	0	0	1
VI	0	0	0	1
VII	0	0	0	0
VIII	0	1	0	0

A previsão de duração deste ensaio era de 6 semanas, mas o facto de estarem a morrer animais, de se observarem sinais de desconforto após a administração de etanol e o facto de na literatura estar descrito que ao fim de 4 semanas o modelo fica completamente estabelecido fez com que a sua conclusão fosse antecipada 2 semanas.

Todos os animais foram monitorizados em relação à evolução do seu peso corporal ao longo do tempo do ensaio e os dados estão representados na Figura IV.3.1.

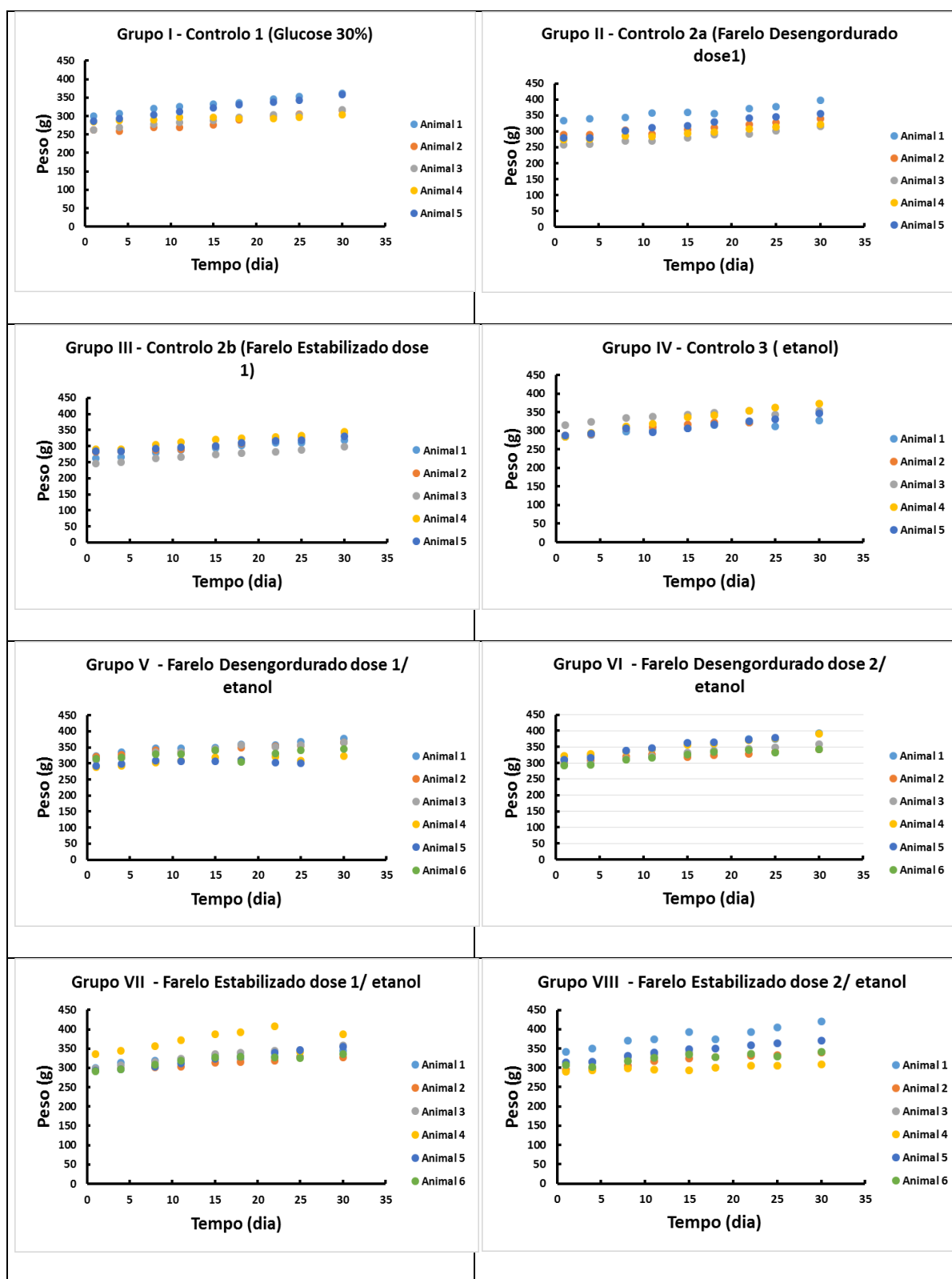


Figura IV.3. 1. Peso dos animais dos vários grupos em estudo durante o tempo do Ensaio C. Cada cor corresponde a um animal do estudo. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol.

Como se pode observar, para os oito grupos em análise, não se observaram diferenças significativas na tendência de crescimento entre os grupos e comparando com os respectivos grupos controlo. A evolução do peso dos animais foi semelhante à curva de crescimento desta mesma espécie/estirpe divulgada pelo fornecedor *Charles River Laboratories* (Figura IV.3.2.).

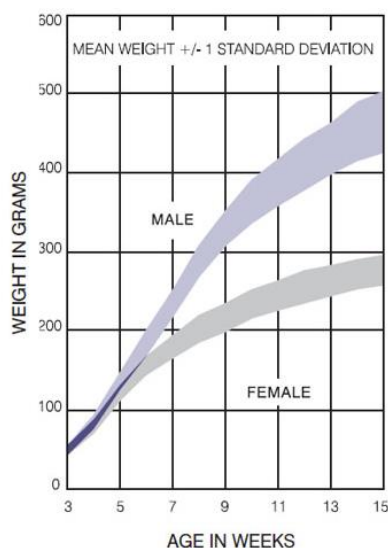


Figura IV.3. 2. Curva de crescimento da espécie/estirpe Wistar do fornecedor Charles River Laboratories.

Tal como nos ensaios anteriores, o consumo de água e de ração foi monitorizado ao longo do ensaio. Os valores referentes ao consumo médio de água e de ração por animal e por grupo de ensaio estão representados, respetivamente, nas Figuras IV.3.3. e IV.4.4.

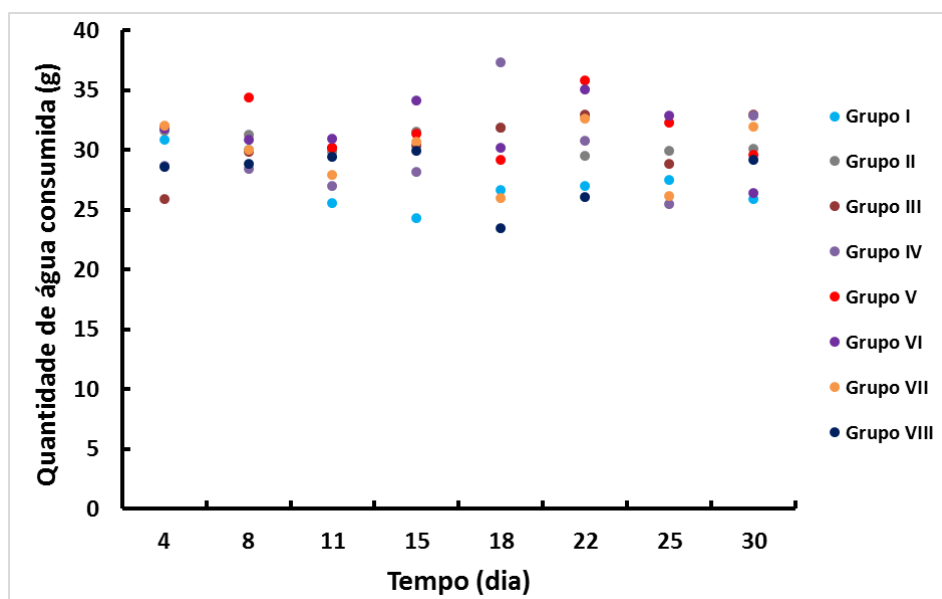


Figura IV.3. 3. Consumo de água, por animal, para cada grupo, durante o ensaio. (n=5) para os grupos: Grupo I – controle 1 (glucose 30%); Grupo II – controle 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controle 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controle 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol.

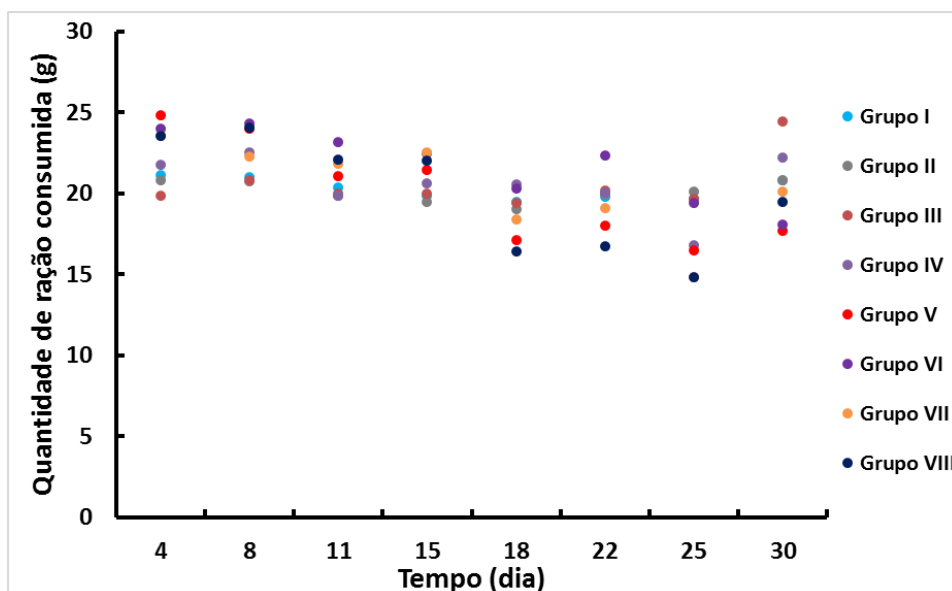


Figura IV.3. 4. Consumo de ração, por animal, para cada grupo, durante o ensaio. (n=5) para os grupos: Grupo I – controle 1 (glucose 30%); Grupo II – controle 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controle 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controle 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol.

Pela análise da Figura IV.3.3., apesar da aparente variabilidade inter-grupo, por dia, dos consumos observados no ensaio, não se observam variações de consumos quer de água quer de ração com significado estatístico ao longo do ensaio.

Os valores médios e respetivos desvios padrão das atividades das enzimas AST, ALT, ALP e gama-GT determinadas no soro dos animais dos diferentes grupos estão representados na Figura IV.3.5.

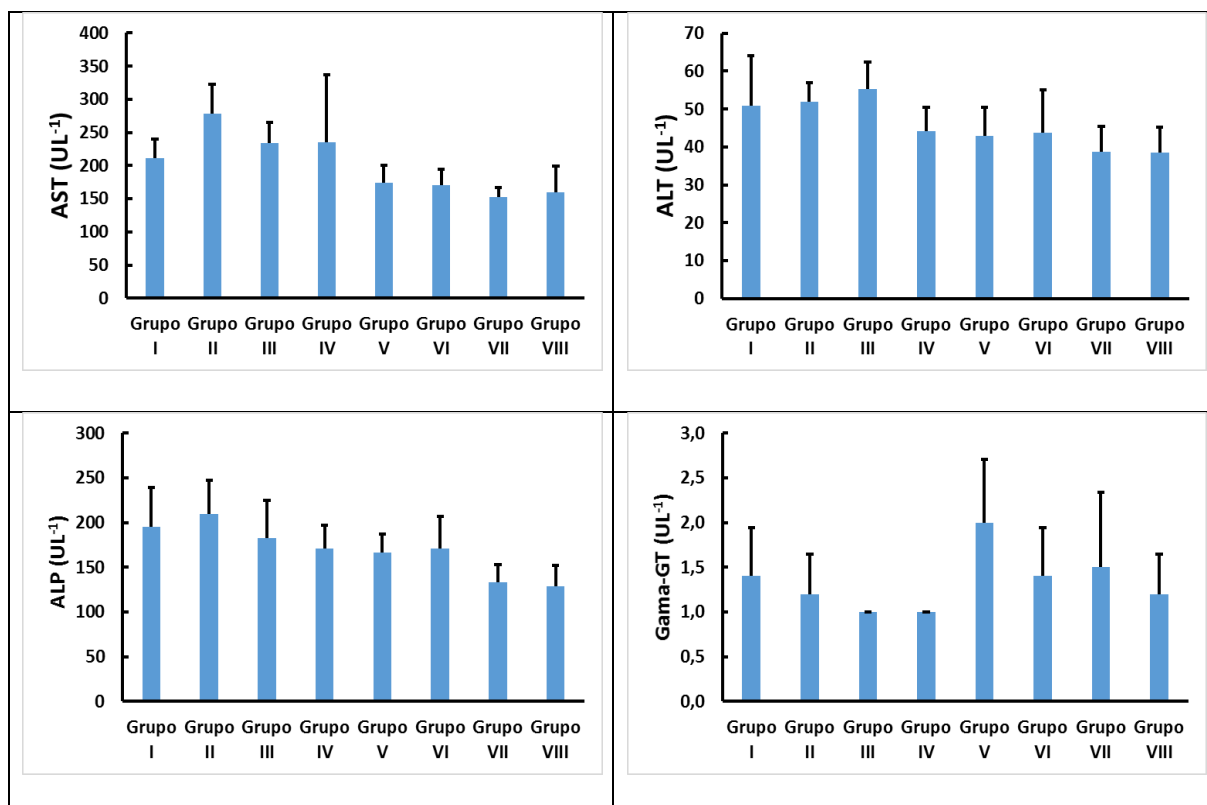


Figura IV.3. 5. Valores das atividades das enzimas AST, ALT, ALP e Gama-GT quantificadas no soro dos animais no final do ensaio. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol.

Como descrito anteriormente, os níveis de atividade das enzimas AST, ALT, ALP e GGT é indicador do *stress* oxidativo induzido pela ingestão continuada de etanol. A potencial inibição por parte do farelo de arroz poderá ser uma medida da atividade antioxidante que este poderá exercer *in vivo*. Seria de esperar um valor elevado para a atividade destes marcadores da função hepática, nos animais do Grupo IV aos quais se administrou etanol, relativamente aos grupos controlos (GI a GIII). No entanto, tal não

se verificou. Este facto limita a interpretação do potencial antioxidante que possa ser atribuído às duas formas de farelo de arroz.

Após a necrópsia dos animais, os órgãos de interesse (fígado, rim e baço) foram recolhidos e os respetivos pesos médios (normalizados ao peso corporal) registados para cada grupo. Esses valores estão apresentados na Figura IV.3.6.

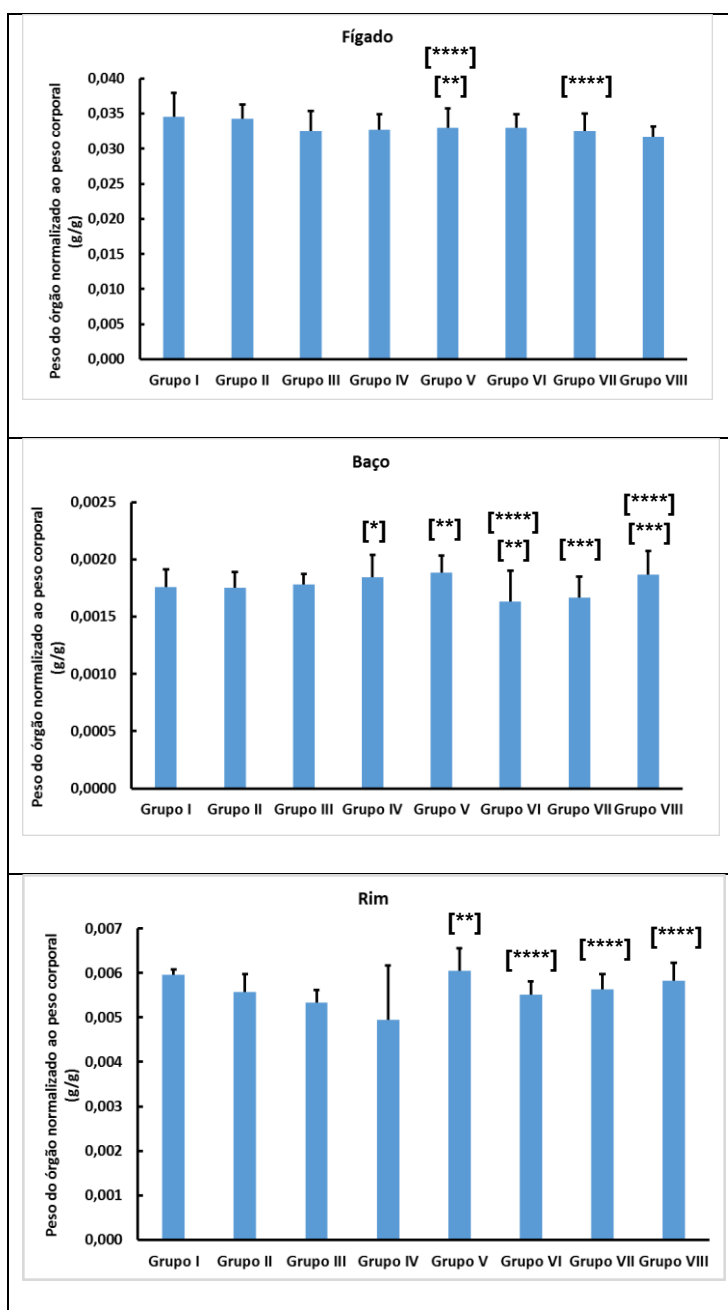


Figura IV.3. 6. Peso dos órgãos normalizado para cada grupo de tratamento. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. (n=5) para os grupos: Grupo I – controlo 1 (glucose 30%); Grupo II – controlo 2a (Farelo de arroz desengordurado 500 mg/kg); Grupo III – controlo 2b (Farelo de arroz estabilizado 500 mg/kg); Grupo IV – controlo 3 (etanol). E (n=6) para os grupos: Grupo V – Farelo Desengordurado 500mg/kg e etanol; Grupo VI – Farelo Desengordurado 250mg/kg e etanol; Grupo VII – Farelo Estabilizado 500mg/kg e etanol; Grupo VIII – Farelo Estabilizado 250 mg/kg e etanol. [*] $p < 0.05$ versus Grupo I; [**] $p < 0.05$ versus Grupo II; [***] $p < 0.05$ versus Grupo III; [****] $p < 0.05$ versus Grupo IV (álcool); (Teste F).

Como referido, os valores apresentados na Figura IV.3.6. foram obtidos por normalização do peso de cada órgão ao peso corporal de cada animal. Pela análise dos dados apresentados (Figura IV.3.6.) relativamente ao peso médio dos órgãos por grupo, observaram-se diferenças com significado estatístico, essencialmente entre os grupos tratados com etanol e farelo de arroz (Grupo V-VIII), relativamente ao grupo controlo que recebeu apenas etanol (Grupo IV).

Nos fígados e baços recolhidos que apresentaram alguma alteração macroscópica foi feita a análise histopatológica. Apenas se observam alterações hepáticas ligeiras, nomeadamente degenerescência hidrópica dos hepatócitos, no Grupo VII (Figura IV.3.7.A), e focos de infiltrados linfóides no Grupo VIII (Figura IV.3.7.B), correspondentes à administração simultânea de etanol e "Farelo estabilizado" na dose mais elevada e mais baixa, respetivamente.

Foram igualmente recolhidos os estômagos de todos os animais e feita a sua análise macroscópica. Foram identificados alguns sinais de possíveis lesões nos estômagos cujos animais foram tratados com etanol. Aos respetivos órgãos foi feita uma análise histopatológica. Em todas as peças de estômago correspondentes a animais dos grupos que receberam etanol observou-se um ligeiro infiltrado inflamatório que não se observa nos grupos sem etanol (Figura IV.C.8).

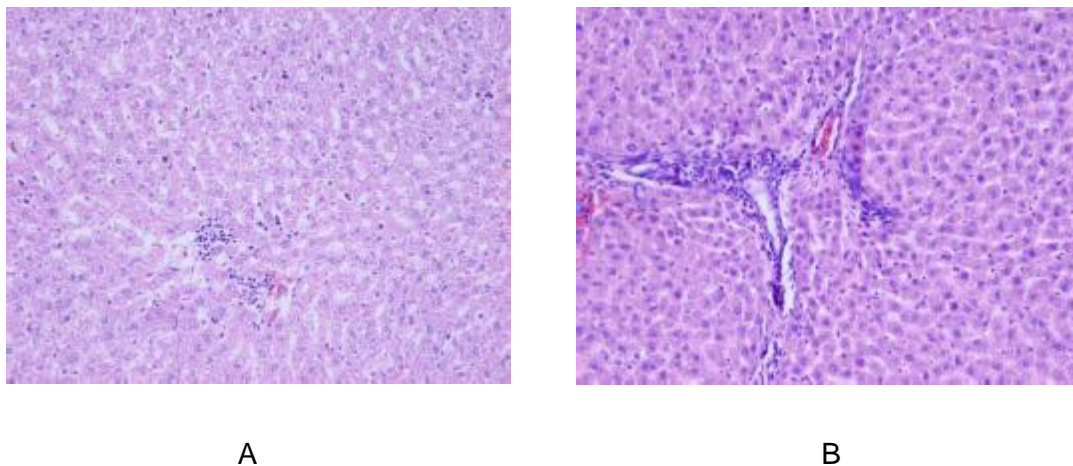


Figura IV.3. 7. A. Microfotografia do fígado de um animal do Grupo VII; B. Microfotografia do fígado de um animal do Grupo VIII; (ampliações, 100x).

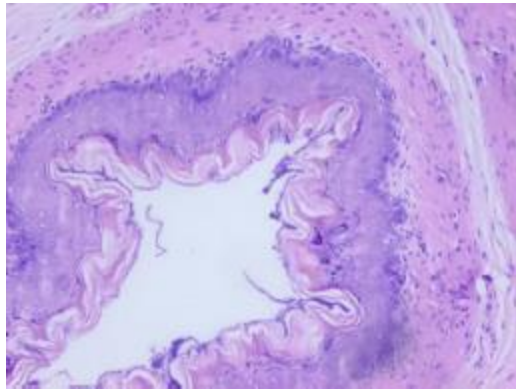


Figura IV.3. 8. Microfotografia do estômago de um animal do Grupo V; (ampliação, 100x).

Na literatura não se encontram descritos estudos de avaliação do farelo de arroz relativamente à proteção contra os efeitos nocivos resultantes da administração de etanol. No entanto, os autores Rana e Giridhar (Rana e Giridhar, 2004), realizaram um ensaio *in vivo* num período de 4 semanas, que permitiu o estudo da capacidade de proteção do *stress* induzido por nitrosodimetilamina no óleo de farelo de arroz. Os animais foram sacrificados uma semana após o *stress* induzido por nitrosodimetilamina (100 mg/kg), tendo resultado numa redução significativa no peso corporal e no consumo de água e ração, bem como, num aumento da atividade das enzimas com função hepática (AST, ALT, ALP). Segundo os autores a introdução de óleo de farelo de arroz na dieta seria benéfico por apresentar um efeito protetor contra o *stress* oxidativo. Neste sentido, e tendo por base este estudo seria interessante estudar o potencial efeito protetor do óleo de farelo de arroz e do farelo de arroz contra o *stress* oxidativo induzido por este agente.

O estudo apresentado neste trabalho, apesar de não ter conseguido resultados muito elucidativos, permite identificar que a conjugação do farelo de arroz e etanol não apresenta, às doses e esquemas estudados, um efeito benéfico na proteção do *stress* induzido pelo etanol.

Ensaio 4 - Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação

Neste ensaio a potencial atividade anti-inflamatória do farelo de arroz foi testada através do modelo agudo de inflamação. Este modelo consiste na indução de uma inflamação utilizando como estímulo inflamatório o carragenano. No sentido de testar a atividade anti-inflamatória, as administrações tem que ser efetuadas num curto período de tempo, antes da indução do modelo, de forma a permitir a observação da evolução deste. Assim, o objetivo do estudo consistiu na avaliação do efeito da administração de farelo e na inflamação da pata. Neste ensaio, como controlo positivo foi usado um fármaco conhecido, a indometacina, um anti-inflamatório de referência que vai permitir validar o modelo.

O volume da pata do rato foi medido por meio de um pletismómetro. A variação do volume da pata é resultante do edema provocado pelo agente inflamatório. E a diminuição desse volume é uma medida da atividade anti-inflamatória do produto a testar. A variação de volume da pata direita dos animais em estudo, medida 6 horas após a indução com carragenano para os diferentes grupos está representada nas Figuras IV.4.1 e IV.4.2.

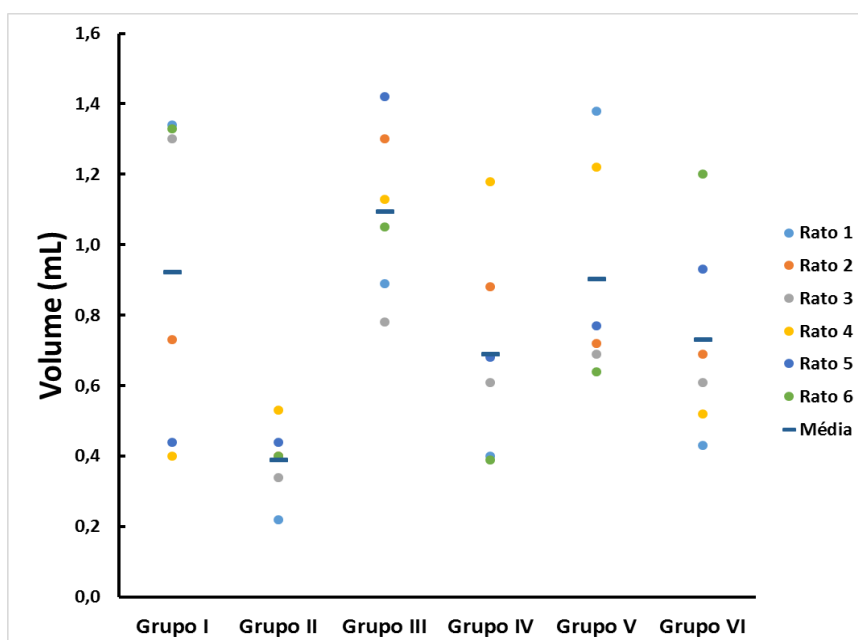


Figura IV.4. 1. Variação do volume da pata, na inflamação induzida pelo Carragenano em cada grupo experimental (n=6). Grupo I – Controlo negativo (água); Grupo II – Controlo positivo (indometacina); Grupo III – Farelo desengordurado dose 1 (500 mg/kg); GIV – Farelo desengordurado dose 2 (250 mg/kg); GV – Farelo Estabilizado dose 1 (500 mg/kg); GVI – Farelo Estabilizado dose 2 (250 mg/kg).

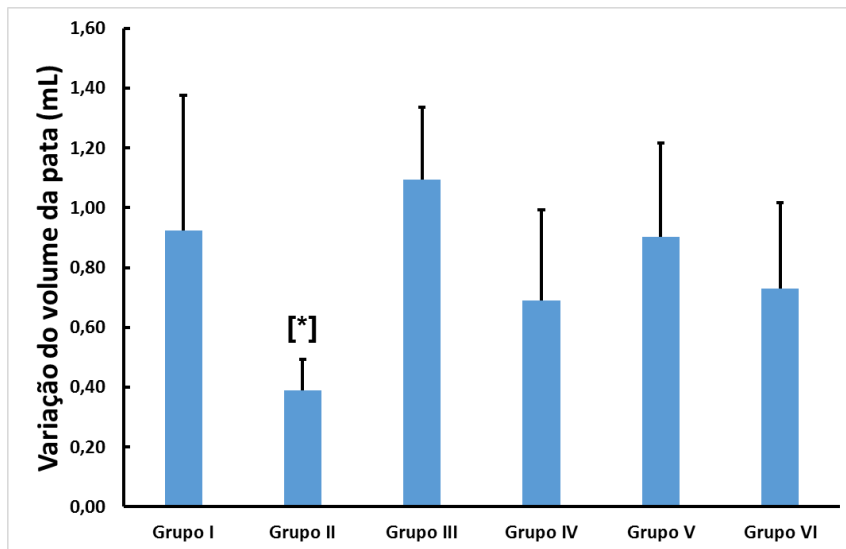


Figura IV.4. 2. Variação média do volume da pata na inflamação induzida pelo Carragenano. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão (n=6). Grupo I – Controlo negativo (água); Grupo II – Controlo positivo (indometacina); Grupo III – Farelo Desengordurado dose 1 (500 mg/kg); GIV – Farelo Desengordurado dose 2 (250 mg/kg); GV – Farelo Estabilizado dose 1 (500 mg/kg); GVI – Farelo Estabilizado dose 2 (250 mg/kg). [*] $p < 0.05$ versus Grupo I (one-way ANOVA).

Com a observação das Figuras IV.4.1. e IV.4.2. poderemos concluir que para os animais dos quatro grupos em que foi administrado farelo de arroz não existem alterações significativas no volume de edema da pata em relação ao grupo que não sofreu qualquer tipo de tratamento (GI - Controlo negativo).

Para uma melhor visualização do potencial efeito anti-inflamatório, foi calculada a percentagem de inibição do edema relativamente ao grupo induzido e não tratado, Grupo I, e encontra-se representado graficamente na Figura IV.4.3.

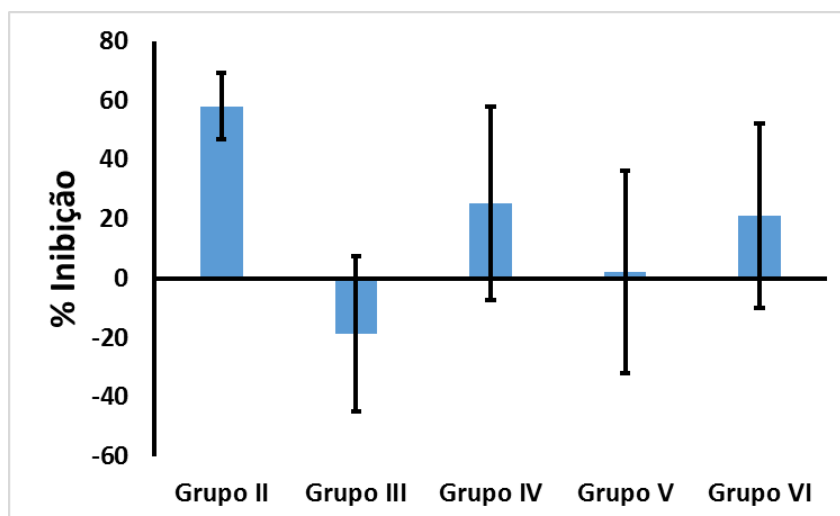


Figura IV.4. 3. Percentagem de Inibição do desenvolvimento do edema, relativamente ao Grupo I de controlo. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão (n=6). Grupo II – Controlo positivo (indometacina); Grupo III – Farelo Desengordurado dose 1 (500 mg/kg); GIV – Farelo Desengordurado dose 2 (250 mg/kg); GV – Farelo Estabilizado dose 1 (500 mg/kg); GVI – Farelo Estabilizado dose 2 (250 mg/kg).

Com a análise da Figura IV.4.3., conclui-se que, nos animais do Grupo II, aos quais foi administrado o anti-inflamatório indometacina, a inibição da inflamação foi de 58%, relativamente ao grupo I de controlo. Nos quatro grupos, aos quais foi administrado farelo de arroz, para doses mais altas (Grupos III e V), a percentagem de inibição do desenvolvimento do edema foi quase nula. Neste ensaio, conclui-se que para as doses mais baixas dos dois farelos testados se observa inibição do edema ainda que não estatisticamente diferente das respetivas doses mais altas.

Não se conhecem estudos na literatura relativamente à atividade anti-inflamatória do farelo de arroz. No entanto, alterações ao protocolo poderão ser benéficas (doses, esquema de administração, etc.) no sentido de esclarecer se o farelo tem potencial anti-inflamatório como parece indicar. Neste sentido, por ventura, o óleo de farelo de arroz por apresentar na sua composição esteróis e ácidos gordos poderá trazer benefícios anti-inflamatórios. Isto porque, outros óleos alimentares que apresentam, igualmente, componentes como esteróis e ácidos gordos, como o óleo de louro da Madeira, testado em modelo animal de inflamação crónica mostrou que quando administrado oralmente a ratos Wistar, exercia um efeito inibidor significativo da redução do edema da pata (Castilho et al., 2002).

V. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, é possível tirar as seguintes conclusões:

Considerando o ensaio que permitiu estudar possíveis sinais iniciais de toxicidade, conclui-se que após uma única administração de farelo, não foram observadas alterações no comportamento dos animais, bem como, diferenças na variação dos pesos dos animais, do peso médio das fezes coletadas, do peso dos órgãos normalizados e dos consumos de água e de ração, quando comparado com o grupo de controlo. Deste modo, apenas uma administração única de farelo, tanto desengordurado como de farelo estabilizado, quer para a dose de 250 mg/kg (dose 1) ou para a dose de 500 mg/kg (dose 2), não está associada a sinais de toxicidade macroscópicos nem microscópicos.

No estudo comparativo respeitante à administração múltipla de farelo de arroz, conclui-se que após 6 administrações de farelo de arroz nas duas doses em estudo, não foram observados sinais macroscópicos de toxicidade, nem alterações no comportamento dos animais. Bem como, não se verificam diferenças na variação dos pesos dos animais, do peso médio das fezes coletadas, do peso dos órgãos normalizados e do consumo de água e ração, quando comparado com o grupo de controlo. No entanto, no grupo II referente ao farelo desengordurado na dose maior são visíveis valores médios mais elevados para os pesos dos órgãos (baço, rim e coração), pelo que seja de admitir que sugerir uma certa toxicidade no farelo desengordurado, talvez possa ser devido a processos de extração do óleo.

Relativamente ao estudo da capacidade de alteração dos níveis de colesterol plasmático, conclui-se que, com apenas uma única administração de farelo de arroz, não é possível estabelecer uma relação com os níveis de colesterol plasmático, pelo que não se pode concluir que exista qualquer benefício para a redução deste. Por outro lado, ao contrário da dose única, com a administração de uma dose múltipla de farelo de arroz já se evidencia uma ação positiva, o que poder-se-á concluir que a ingestão repetida de farelo de arroz poderá estar associada a modificações dos níveis de colesterol, contudo carece de estudos posteriores.

O estudo relativo à capacidade de proteção de diferentes doses de farelo de arroz estabilizado e desengordurado em contraste com a administração contínua de etanol, não se observam variações de consumos ao longo do ensaio que se destaquem com significado estatístico quando comparados com os respetivos grupos de controlo. No

entanto, a avaliação do peso médio dos órgãos revelou diferenças com significado estatístico, essencialmente entre os grupos tratados com etanol e farelo de arroz, relativamente ao grupo controlo que recebeu apenas etanol. Nomeadamente, em todas as peças de estômago correspondentes a animais dos grupos que receberam etanol observou-se um ligeiro infiltrado inflamatório que não se observa nos grupos sem etanol. Em conclusão, traduz-se num estudo pouco conclusivo, contudo podemos salientar que a conjugação do farelo de arroz e etanol não apresentou, às doses e esquemas estudados, um efeito benéfico na proteção do *stress* induzido pelo etanol.

Relativamente ao estudo da potencial atividade anti-inflamatória do farelo de arroz, conclui-se que para as doses mais baixas dos dois farelos testados observou-se tendência para a inibição do edema no entanto sem significado estatístico. No entanto, este estudo permitiu observar ligeiros sinais que sugerem a possibilidade do farelo de arroz apresentar atividade anti-inflamatória, mas seria interessante a realização de novos estudos com alterações ao protocolo (doses, esquema de administração, etc.) no sentido de esclarecer e testar eventuais mecanismos de ação do farelo de arroz como potencial anti-inflamatório.

Como perspetivas futuras deste trabalho propõe-se a alteração da formulação das amostras de farelo de arroz, pelo que se poderia modificar a sua preparação de modo a obter um preparado que seja de mais fácil administração, no sentido de facilitar a suspensão e fundamentalmente não se perder características essenciais do produto. Neste trabalho foram utilizados dois tipos de farelo (estabilizado e desengordurado), no entanto seria interessante, desenvolver estudos com outras frações do farelo de arroz, como o óleo ou ainda, extrair componentes bioativos presentes no farelo de arroz.

Como estudos futuros relativamente aos níveis de colesterol plasmático propõe-se a realização de ensaios em animais com hipercolesterolemia, com alteração da dieta normal para uma dieta rica em gordura em que aumentasse os níveis de colesterol plasmático, permitindo assim estudar neste caso o efeito da administração de farelo e obter resultados mais conclusivos.

No ensaio do estudo do efeito protetor do farelo observaram-se alterações hepáticas ligeiras, já a nível do estômago todos os grupos de etanol e farelo observou-se um ligeiro infiltrado inflamatório, pelo que seria interessante desenvolver o ensaio relativo à capacidade de proteção do farelo a nível do estômago, com a utilização de modelos específicos de proteção de úlceras gástricas.

Contudo, e associado a esta temática está a escassa bibliografia que se encontra disponível, neste sentido será ainda necessário existirem mais estudos do modo de

ação, ensaios pré-clínicos e de toxicidade, e ensaios clínicos, para esclarecer todo o potencial nutricional, funcional e terapêutico deste subproduto ainda muito desvalorizado.

VI. Referências Bibliográficas

- Abdel-Aal, E. S. M., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76, 350 – 354.
- ABOISSA, 2015. Empresa Aboissa de Óleos Vegetais. Farelo e óleo de arroz. [Online]. Disponível em: <http://www.aboissa.com.br> [Acedido: 12-7-2015].
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N., & Arai, K. (2000). Triterpene Alcohol and Sterol Ferulates from Rice Bran and Their Anti-Inflammatory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2313–2319.
- Amador, E., Dorfman, L. E. and Wacker, W.E.C., (1965) Urinary alkaline phosphatase and LDH activities in the differential diagnosis of renal disease. *Ann. Intern. Med.* 62, 30-40.
- Amarasinghe, B.M.W.P.K., & Gangodavilage, N.C. (2004). Rice bran oil extraction in Sri Lanka: data for process equipment design. *Food and Bioproducts Processing*, 82(54–59).
- Amarasinghe, B.M.W.P.K., Kumarasiri, M.P.M., Gangodavilage, N.C. 2009. Effect of method of stabilization on aqueous extraction of rice bran oil. *Food Bioprod. Process.* 87, 108-114.
- Amdekar S., Roy, P., Singh, V., Kumar, A., Singh, R. and Sharma, P. (2012). Anti-Inflammatory Activity of *Lactobacillus* on Carrageenan-Induced Paw Edema in Male Wistar Rats. *International Journal of Inflammation*, 1-6.
- Barber, S. and Benedito-de, B. C. (1980). Rice bran: Chemistry and technology. In: *Rice: Production and Utilization*. Luh, D. S., Ed., AVI Publishing Co., Westport, CT, USA.
- Barbosa, K., Costa, N, Afenas, R., De Paula, S., Minim, V., Bressan, J. (2010). Oxidative Stress: Concept, implications and modulating factors. *Journal of Nutrition*, 23(4), pp.629-643.
- Badcock, D. 1987. "Rice bran as a source of dietary fiber", *Cereal Foods World* 32, 538-539.
- Bergmeyer, H.U., Scheibe, P. and Wahlefeld, A .W. (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical Chemistry* January; vol. 24 nr. 1, 58-73.

- Bessemers, J. G. M.; Geraets, L. (2013). Proper knowledge on toxicokinetics improves human hazard testing and subsequent health risk characterization. A case study approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67, pp. 325-334.
- Bhattacharya, K. R. (2011). *Rice quality: A guide to rice properties and analysis*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Botelho, N. (2012). Tecnologias pós-colheita de arroz. *Agrotec: Revista técnico-científica agrícola*. Nº 3
- Borresen, E.C. & Ryan, E.P., (2014). Rice Bran: A food Ingredient with Global Public Health Opportunities. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health* 22. 301-310.
- Carroll, L. E. (1990). Functional Properties and Applications of Stabilized Rice Bran in Bakery Products. *Food Technology*, 44(4), 74-76.
- Castilho, P.; Rodrigues, A.I.; Costa, M. C.; Corvo L. (2002). Patente de invenção nº 102839 para "composição farmacêutica baseada em óleo de louro (L. azorica (Seub) e sua utilização como agente anti-inflamatório em mamíferos.
- Chan, K.W., Khong, M.H., Iqbal, S., & Ismail, M. (2013). Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran. *Journal of Cereal Science*, 57, 480–485.
- Chang, T. & Bardenas, E. A., 1965. *The Morphology and Varietal Characteristics of the Rice Plant*, Laguna, The Philippines: The International Rice Research Institute.
- Cheng, H.H., Huang, H.Y., Chen, Y.Y., Huang, C.L., Chang, C.J., Chen, H.L., et al. (2010). Ameliorative effects of stabilized rice bran on type 2 diabetes patients. *Ann Nutr Metab*;56(1):45–51.
- Chen, C.W., & Cheng, H.H. (2006). A rice bran oil diet increases LDL-receptor and HMG-CoA reductase mRNA expressions and insulin sensitivity in rats with streptozotín/nicotinamide-induced type 2 diabetes. *Journal of Nutrition*, 136, 1472–1476.
- Cicero, A.F., Derosa, G. (2005). Rice bran and its main components: potential role in the management of coronary risk factors. *Curr Top NutrRes*; 3(1):29–46.
- Colantoni, A., La Paglia, N., De Maria, N., Emanuele, M.A., Emanuele, N.V., Idilman, R., Harig, J. & Van Thiel, D.H. (2000). Influence of sex hormonal status on alcohol-induced oxidative injury in male and female rat liver. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 24 (9): 1467-1473.

Collins, T. 1999. Acute and chronic inflammation. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders, cap. 3, p. 50-88.

Cruz, A. S. 2003. Teste de Citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de draize na avaliação de produtos cosméticos. Tese (Doutorado Produção e Controles Farmacêuticos). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Dang, T.T. (2015). Value-added processing of rice bran focusing on dietary fiber modification. Department of Agricultural, Food and Nutritional Science University of Alberta.

Devi, R.R., & Arumughan, C. (2007). Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. Bioresource Technology, 98, 3037–3043.

Dipti, S., Bergman, C., Indrasari, S.D., Herath, T., Hall, R., Lee, H., et al. (2012). The potential of rice to offer solutions for malnutrition and chronic diseases. Rice; 5:1–18.

Dreher, M.L. (1987). Handbook of dietary fibre: na applied approach. New York: Marcel Dekker.

Durrington, P; Sniderman, A. (2004). Fast Facts – Hiperlipidémia, Health Press, Oxford (Reino Unido).

Duve, J.K., & White, P.J. (1991). Extraction and identification of antioxidants in oats. Journal of American Oil Chemists Society, 68, 365–370.

Erlich, R. (2004). "Cultural and historical trends and influences of food, nutrition and cuisine on health and development." Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 13(2): 125-130.

Fabian, C., & Ju, Y.H. (2011). A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. Critical reviews in Food Science & Nutrition, 51, 816–827.

FAOSTAT (2012) Database of food and agriculture organization. Rome. Italy. [Online] Disponível: <http://faostat.fao.org>. [Acedido: 15-3-2015]

Faccin, G.L., Vieira, L.N., Miotto, L.A., Barreto, P.L.M., & Amante, E.R. (2009). Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. Rice Science, 16, 226–234.

Food and Agriculture Organization (FAO), 2013. FAO Rice Market Monitor, Volume XVI, Issue no. 4 [Online] Disponível:

<http://www.fao.org/economic/est/publications/ricepublications/rice-market-monitor-rmm/en/>. [Acedido: 15-3-2015].

Freeman, D.W. 2006. Use of by-product and nontraditional feeds for horses. [Online] Disponível: <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3923web.pdf>. [Acedido: 17-6-2015].

Friedman, M. (2013). Rice Brans, Rice Bran Oils, and Rice Hulls: Composition, Food and Industrial Uses, and Bioactivities in Humans, Animals, and Cells. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10626-10641.

Froy, O. (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology* 28 (2-3): 61-71.

Gerhardt, A.L., Gallo, N.B. (1998). Full-fat rice bran and oat bran similarly reduce hypercholesterolemia in humans. *J Nutr* 1998;128(5):865–9.

Godber, J.S. and Well, J.H. (1994). Rice bran: as a viable source of high value chemicals. *Louisiana Agriculture*, 37(2), 13-17.

Gomes, S. (2015). “Transformação - ARROZ.” [Online]. Disponível em: <http://nossoarroz.weebly.com/transformaccedilatildeo.html>. [Acedido: 03-8-2015].

Grist, D.H. (1985). *Rice* (5th ed.). London, UK: Longman

Hammond, N. 1994. Functional and nutritional characteristics of rice bran extracts. *American Cereal Chemists*, Saint Paul, v. 39, n. 10, p. 752-754.

Hegsted, M. and Windhauser, M., 1993, Reducing human heart disease risk with rice bran. *La. Agric.* 36:3.

Henderson, A.J., Ollila, C.A., Kumar, A., Borresen, E.C., Raina, K., Agarwal, R., et al. (2012). Chemopreventive Properties of Dietary Rice Bran: Current Status and Future Prospects. *Adv Nutr*; 3(5):643–53.

Hsieh, YL., Yeh, YH., Lee, YT. And Huang, CY. (2014). Protective effects os Cholestin on etanol induced oxidative stress in rats. *J. Sci. Food Agric* 95:799-808.

Hu, G., Huang, S., Cao, S., & Ma, Z. (2009). Effect of enrichment with hemicellulose from rice bran on chemical and functional properties of bread. *Food Chemistry*, 115(3), 839–842.

Hu, W., Wells, J. H., Shin, T. S. and Godber, J. S. 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soci.* 73:1653–1656.

INE (Instituto Nacional de Estadística). 2014. Estadísticas agrícolas 2014, Instituto Nacional de Estadística, I.P.

Iqbal S, Bhanger M, Anwar F. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*; 93: 265-272.

Islam, M.S., Nagasaka, R., Ohara, K., Hosoya, T., Ozaki, H., Ushio, H., et al. (2011). Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. *Curr Top Med Chem*, 11:1847-53.

Kahlon, T. S., Saunders, R. M., Chow, F. I., Chiu, M. M., and Betschart, A. A. 1990. Influence of rice bran, oat bran, and wheat bran on cholesterol and triglycerides in hamsters. *Cereal Chem.* 67:439.

Kahlon, T. S., Sayre, R. N., Chow, F. I., and Betschart, A. A. 1991. The relative effects of rice bran at various levels, defatted rice bran and rice bran oil on plasma and liver cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. (Abstr.) *FASEB J.* 5:1287.

Kahlon, T.S., Chow, F.I., Chiu, M.M., Hudson, C.A., Sayre, R.N. (1996). Cholesterol-lowering by rice bran and rice bran oil unsaponifiable matter in hamsters. *Cereal Chem*; 73(1):69–74.

Karmen, A., Wroblewski, F., Ladue, J.S. (1955). Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest.*; 34(1):126–131.

Khan, S.H., Butt, M.S., Sharif, M.K., Sameen, A., Mumtaz, S., Sultan, M.T., 2011. Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat, and parboiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2416–2420.

Kim, J.S.; Godber, J.S. 2001. Oxidative stability and vitamin E levels increased in restructured beef roast with added rice bran oil. *Journal Food Qual.*, n. 24, p.17-26.

Lakkakula, N.R., Lima, M., & Walker, T. (2004). Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource Technology*, 92, 157–161.

Liu, L., D. L. E. Waters, et al. (2013). "Phospholipids in rice: Significance in grain quality and health benefits: A review." *Food Chemistry* 139(1-4): 1133-1145.

Johns, M. A. and L. Mao (2007). "Differentiation of the two rice subspecies indica and japonica: a Gene Ontology perspective." *Functional & Integrative Genomics* 7(2): 135-151.

Jariwalla, R. J. (2001). Rice-bran products: phytonutrients with potencial application in preventive and clinical medicine. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 27, 17-26.

Juliano, B. O (1985). *Rice Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists Cap.2, p.17-57; 647-687.

Juliano, O. (1993). "Rice in human nutrition - Contents," *FAO Corporate Document Repository*. [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E00.htm#Contents>. [Acedido: 20-7-2015].

Juliano, B. O. and Bechtel, D. B. 1985. The rice grain and its gross composition. pp 17 - 57.

JOSAPAR. [Online] Disponível em: <http://www.josapar.com.br/>. [Acedido: 21-9-2015].

Midio, A; Martins, I (2000). *Toxicologia de alimentos*. 1 edição São Paulo Varela.

Ministério Agricultura, D. R. e. P. (2000). Decreto-Lei n.º 62/2000 de 19 de Abril. Portugal, Diário da República. 93 SÉRIE I-A: 1689-1691.

Malekian, F., Rao, R. M., Prinyawiwatkul, W., Marshall, W. E., Windhauser, M., & Ahmedna, M. (2000). Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. *Louisiana Agricultural Experiment Station Bulletin*, 870, 1–68.

Mariod, A.A., Adamu, H.A., Ismail, M., & Ismail, N. (2010). Antioxidative effects of stabilized and unstabilized defatted rice bran methanolic extracts on the stability of rice bran oil under accelerated conditions. *Grasas y Aceites*, 61(4), 409–415.

Marshall, W.E. 1993. "Utilization of rice bran/hulls in value-added products", *Proceedings of Rice Utilization Workshop Developing Innovative, Non-Convencional Uses for Rice*, New Orleans, LA. pp. 68-76.

Mazza, G. 1998. *Functional foods: biochemical & processing aspects*. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pennsylvania. pp. 71-89.

McCance, K.L.; Huether, S.E. 1998. *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children*. 3th ed. St. Louis: Mosby, cap. 7, p. 205-236.

Mccaskill, D.R.; Zhang, F. 1999. Use of rice bran oil in foods. *Food Technology*, v. 53, n.2, p. 50-53.

McKee, T. (1999). *Biochemistry: An Introduction*. 2ed. United States of America. McGraw-Hill, pp.316-329.

Morgenstern, S., Flr, R., Kessler, G., and Klein, B., (1965) Automated determination of NAD-coupled enzymes. Determination of lactic dehydrogenase. *Anal. Biochem.* 13, 149-161.

Morgernstern, S., Rush, R., and Lehman, D., (1973) *Advances in Automated Analysis*, Technicon International Congress, Vol. I, pp 15-19.

Most, M.M., Tulley, R., Morales, S., Lefevre, M. (2005) Rice bran oil, not fiber, lowers cholesterol in humans. *Am J Clin Nutr* ;81(1):64–8.

Moon J.K. and Shibamoto, T. (2009). "Antioxidant assays for plant and food components", *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1655–1666.

Nanuna, J.N., McGregor, J.U., & Godber, J.S. (2000). Influence of high-oryzanol rice bran oil on the oxidative stability of whole milk powder. *Journal of Dairy Science*, 83, 2426–2431.

Nasirullah, Krishnamurthy, M. N., & Nagaraja, K. V. (1989). Effect of Stabilization on the Quality Characteristics of Rice-Bran Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 66(5), 661-663.

Nordqvist, C. (2015) [Online]. Disponível em: <http://www.medicalnewstoday.com/articles>. [Acedido: 1-10-2015]

Novarroz. (2015). "A produção de arroz em Portugal." 2015, [Online]. Disponível em: <http://novarroz.pt/mundo-do-arroz/historia-do-arroz/a-producao-de-arroz-em-portugal/>. [Acedido: 20-7-2015].

Oliveira, M.C. e Schoffen, J.P. (2010). Oxidative stress Action in Cellular Aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology. An International Journal*, 53(6), pp.1333-1342.

Orthoefer, F.T. 1996. Rice bran oil: healthy lipid source. *Food Technology*, n.50, p. 62-64.

Pari, L., Suresh, A. (2008). Effect of grape (*Vitisvinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1627-1634.

Patel, M. e Naik, S. (2004) Gamma-oryzanol from rice brain oil – A review. *J Sci Ind Research* 63: 569-578.

- Prabhakar, J. V., & Venkatesh, K. V. L. (1986). A Simple Chemical Method for Stabilization of Rice Bran. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63(5), 644-646.
- Prasad, N. M. N., Sanjay, K. R. , Khatokar, S. M., Vismaya, M. N., & Swamy, N. S. 2011. Health Benefits of Rice Bran - a Review. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(1), 108.
- Pomeranz, Y., & Ory, R. L. (1982). Rice Processing and Utilization. In Ivan A. Wolff (Ed.), *Handbook of Processing and Utilization in Agriculture* (Vol. 2). West Palm Beach, FL: CRC press.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M., Kawakishi, N. (1989). Studies on changes in fatty acid composition and content of endogenous antioxidant during gammairradiation of rice seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66, 105-108.
- Ramezanzadeh, F.M., Rao, R.M., Windhauser, M., Prinyawiwatkul, W., Tulley, R., Marshall, W.E., 1999. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran during storage. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3050-3052.
- Rana, P., Vadhera, S., Giridhar S. (2004). In vivo antioxidant potential of rice bran oil (RBO) in albino rats. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 48(4):428-36.
- Randall, J. M., Sayre, R. N., Schultz, W. G., Fong, R. Y., Mossman, A. P., Tribelhorn, R. E., & Saunders, R. M. (1985). Rice Bran Stabilization by Extrusion Cooking for Extraction of Edible Oil. *Journal of Food Science*, 50(2), 361-364.
- Richards, A.H., Luinski, R.M., and Vanderline, R.E. (1975) Studies on the kinetic assay of lactate dehydrogenase activity. *Clin. Chem.* 21:1018.
- Reguengo, H. (2010). Influência do stress oxidativo no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. Avaliação de marcadores bioquímicos.
- Rodrickes, J. V., Gaylor, D. W. e Turnbull, D. (2001). Quantitive Extrapolations in Toxicology. *Principles and Methods of Toxicology*. pp. 365-383.
- Roy, P., T. Ijiri, et al. (2008). "Effect of processing conditions on overall energy consumption and quality of rice (*Oryza sativa* L.)." *Journal of Food Engineering* 89(3): 343-348.

- Rukmini, C., & Raghuram, T. C. (1991). Nutritional and Biochemical Aspects of the Hypolipidemic Action of Rice Bran Oil - a Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 10(6), 593-601.
- Ryan, G.B. & Majno, G. 1977. Acute inflammation. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v. 86, n. 1, p. 184-271.
- Saikia, D., & Deka, S. C. (2011). Cereals: from staple food to nutraceuticals. *International Food Research Journal*, 18, 21-30.
- Salanti, A., Zoia, L., Orlandi, M., Zanini, F. and Elegir, G. (2010). "Structural Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Lignins from Rice Husk", *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10049–10055.
- Sampayo, C.; Corvo, M.L.; Mendes, R.; Duarte, D.; Lucas, J.; Pinto, R.; Batistas, A.P.; Raymundo, A.; Lima, B.S.; Bandarra, N.M.; Gouveia, L. 2013. Insights on the safety of carotenogenic *Chlorella vulgaris* in rodents. *Algal Research*, Vol. 2, p. 409-415.
- Sanders, T. A. B.; Reddy, S. (1992). The influence of rice bran on plasma lipids and lipoproteins in human volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr*, 46, 167–172.
- Sarika, A., Purabi, R., Vinod, S., Avnish, K., Rambir, S., and Poonam, S. 2012. Anti-Inflammatory Activity of *Lactobacillus* on Carrageenan-Induced Paw Edema in Male Wistar Rats, *International Journal of Inflammation*
- Saunders, R.M. (1990). The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Foods World*. 35:632–639.
- Schramm, R., Alicia, A., Hua, N., Xu, Z., & Lima, M. (2007). Fractionation of the rice bran layer and quantification of vitamin E, oryzanol, protein and rice bran saccharide. *Journal of Biological Engineering*, 1, 9.
- Seetharamaiah, G. S., & Chandrasekhara, N. (1989). Studies on Hypocholesterolemic Activity of Rice Bran Oil. *Atherosclerosis*, 78(2-3), 219-223.
- Sharif, M. K., Butt, M. S., Anjum, F. M. and Khan, S. H. (2014) "Rice bran: a novel functional ingredient", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54, 807–16.
- Sharma, H.R., Chauhan, G.S., Agrawal, K., 2004. Physico-chemical characteristics of rice bran processed by dry heating and extrusion cooking. *Int. J. Food Prop.* 7, 603-614.
- Sharma, S.C. (1981). Gums and hydrocolloids in oil-water emulsion. *Food Technology*, 35, 59–67.

- Shaw, L.M., London, J.W., Fetterolf, D., Garfinkel, D. (1977). Gamma-Glutamyltransferase: kinetic properties and assay conditions when gamma-glutamyl-4-nitroanilide and its 3-carboxy derivative are used as donor substrates. *Clinical Chemistry* vol. 23 (1) 79-85.
- Shepherd, J. (2001). The role of the exogenous pathway in hypercholesterolaemia, *European Heart Journal Supplements*, Volume 3, Suplemento E2-E5.
- Sherwood, E.R. & Toliver-Kinsky, T. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, London, v. 18, n. 3, p. 385-405.
- Shih, F.F., & Daigle, K.W. (2003). Antioxidant properties of milled-riceco-products and their effects on lipid oxidation in ground beef. *Journal of Food Science*, 68, 2672–2675.
- Spady, D.K. and Dietschy, J.M. (1985). Rates of cholesterol synthesis and low-density lipoprotein uptake in the adrenal glands of the rat, hamster and rabbit in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 836:167-175
- Talwalker R.T., Garg, N.K., Krishnamurti, C.R. (1965). Rice bran-a source material for pharmaceuticals. *J Food Sci Technol* 2: 117-119.
- Tao, J., Rao, R.M., Liuzzo, J.A., 1993. Thermal efficiencies of conventional and microwave heat stabilization of rice bran. *La. Agric.* 36, 15.
- Tietz, N. W. (1980). Progress in the development of a recommended method for alkaline phosphatase activity measurements, *Clinical Chemistry*, 26, 1023.
- Qi, Y. W., H. L. Zhang, et al. (2009). "Assessing indica-japonica differentiation of improved rice varieties using microsatellite markers." *Journal of Genetics and Genomics* 36(5): 305-312.
- Van Hoed, V., Depaemelaere, G., Ayala, V.J., Santiwattana, P., Verhé, R., & De Greyt, W. (2006). Influence of chemical refining on the major & minor components of rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, 315–321.
- Vaughan, D. A., B. R. Lu, et al. (2008). "The evolving story of rice evolution." *Plant Science* 174(4): 394-408.
- Vitaglione, P., Morisco, F., Caporaso, N., Fogliano, V. 2004. Dietary antioxidante compounds and liver health. *Crit. Rev. Food Sci Nutr* 44:575-586.
- Walter, M., Marchezan, E. and De Avila, A. (2008). "Arroz : composição e características nutricionais", *Ciência Rural*, 38, 1184–1192.

- Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W. and Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 47(2):411–416.
- Wani, A.A., Gul, K., Yousuf, B., Singh, A.K., Singh, P. (2015). Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6, 24-30.
- Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v. 111, p. 544-547.
- Wroblewski, F., Ladue, J.S. (1956). Serum Glutamic Pyruvic Transaminase in Cardiac and Hepatic Disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91: 569.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T., & Takido, M. (1998). Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21, 1072–1076.
- Yoon, S.H., Kim, S.K. (1994). Oxidative stability of high fatty acid rice bran oil at different stages of refining. *JAOC* 75: 227-229.
- Younas, A., Bhatti, M.S., Ahmed, A., Randhawa, M.A. (2011). Effect of rice bran supplementation on cookie baking quality. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 48(2), 129-134.
- de Delahaye, E.P., Jimenez, P., & Perez, E. (2005). Effect of enrichment with high content dietary fibre stabilized rice bran flour on chemical and functional properties of storage frozen pizzas. *Journal of Food Engineering*, 68, 1–7.